

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREA CRISTINE KOISHI

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS
EXTRAÍDAS DE MACROALGAS MARINHAS E DE UM PAINEL DE
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS NA INIBIÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
DA DENGUE EM MODELO *IN VITRO*

CURITIBA
2014

ANDREA CRISTINE KOISHI

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS EXTRAÍDAS DE
MACROALGAS MARINHAS E DE UM PAINEL DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS NA
INIBIÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM MODELO *IN VITRO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos
Co-orientador: Dr. Juliano Bordignon

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Koishi, Andrea Cristine

Caracterização do efeito de substâncias naturais extraídas de macroalgas marinhas e de um painel de substâncias sintéticas na inibição da infecção pelo vírus da dengue em modelo in vitro. / Andrea Cristine Koishi. – Curitiba, 2014.

129f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Claudia Nunes Duarte dos Santos

Co-orientador: Juliano Bordignon

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue . 2. Antraquinonas. I. Título II. Santos, Claudia Nunes Duarte dos. III. Bordignon, Juliano. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos
Orientadora e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Luiz Felipe Caron
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Priscilla Fanini Wowk
Instituto Carlos Chagas - ICC.

E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Andrea Rodrigues Ávila
Instituto Carlos Chagas - ICC

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Andrea Cristine Koishi**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização do efeito de substâncias naturais extraídas de macroalgas marinhas e de um painel de substâncias sintéticas na inibição da infecção pelo vírus da dengue em modelo *in vitro*", são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

*à minha Família, em especial, aos meus pais que
sempre me apoiaram e incentivaram a buscar
por meus objetivos, e a minha irmã pela força e
companheirismo durante todos esses anos.*

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos e Dr. Juliano Bordignon, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e pela orientação científica que tanto contribuíram para meu aprendizado e crescimento.

Aos colaboradores Dr. Everson Miguel Bianco, Dr. Mauro Vieira de Almeida e a Dra. Taís Arthur Correa, que gentilmente nos cederam as substâncias e diversas ideias para este trabalho.

Ao Dr. Lucio Freitas Junior, ao Instituto Pasteur da Coréia e todos os membros do CND3 por proporcionar uma grande experiência científica e de vida.

Aos membros do Laboratório de Virologia Molecular, pela amizade, convivência, ajuda, companheirismo, e por todo o apoio a mim conferido. Em especial à Paula Rodrigues Zanello pela ajuda dentro e fora do laboratório, e ao Guilherme Ferreira Silveira pelo auxílio com os experimentos de citometria de fluxo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

À FIOCRUZ, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

À minha família pela confiança e apoio irrestrito.

A todos enfim que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento sincero.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

A dengue é um problema de saúde pública mundial. Apesar do importante impacto clínico e social, não existem vacinas ou terapias específicas para a prevenção ou o tratamento da infecção pelo vírus da dengue (DENV). Considerando o exposto, a pesquisa pela descoberta de drogas para dengue é de extrema importância. Além disso, extratos naturais de origem marinha podem fornecer estruturas químicas novas e diversas com atividade biológica potente que necessitam ser avaliadas, assim como substâncias químicas sintéticas. Neste estudo foi proposta uma abordagem sem alvo específico para a descoberta de drogas contra dengue, baseado em um novo, rápido e econômico ELISA em célula. O *in situ* ELISA foi padronizado e validado para a linhagem celular Huh7.5 infectada com os quatro sorotipos do DENV, entre eles isolados clínicos e cepas adaptadas de laboratório. Análises estatísticas mostraram um valor médio de S/B de 7,2 e fator-Z de 0,62, demonstrando a consistência e segurança do ensaio. Um painel de quinze extratos de algas foi triado com a concentração não tóxica determinada pelos ensaios de MTT e vermelho neutro. Oito extratos de algas foram capazes de reduzir a infecção pelo DENV para pelo menos um sorotipo testado. Quatro extratos (*Phaeophyta*: *Canistrocarpus cervicornis*, *Padina gymnospora*; *Rhodophyta*: *Palisada perforata*; *Chlorophyta*: *Caulerpa racemosa*) foram escolhidos para uma avaliação mais aprofundada, e estudos de tempo de adição apontam que eles podem atuar em estágios iniciais do ciclo de infecção, como adsorção ou internalização. Além disso, foi realizada a triagem antiviral com 49 substâncias químicas sintéticas, das quais oito antraquinonas apresentaram atividade anti-dengue em linhagem celular Huh7.5 e foram testadas em culturas de células mononucleares do sangue periférico de doadores humanos saudáveis. Os tratamentos com TAC02, TAC12 e LSF23 foram capazes de diminuir a porcentagem de células infectadas a níveis comparados ao IFN- α 2A, usado como substância referência. Dessa forma, foi apresentado um método confiável, de baixo custo e fácil execução para a triagem de substâncias com atividade anti-DENV, com resultados promissores partindo de produtos naturais e substâncias químicas sintéticas.

Palavras- chave: vírus da dengue, antiviral, *in situ* ELISA, extratos de algas, substâncias sintéticas, antraquinona.

ABSTRACT

Dengue is a significant public health problem worldwide. Despite the important social and clinical impact, there is no vaccine or specific antiviral therapy for prevention or treatment of dengue virus (DENV) infection. Considering the above, drug discovery research for dengue is of utmost importance; in addition natural marine extracts could provide diverse and novel chemical structures with potent biological activities that must be evaluated, as well as synthetic chemical molecules. In this study we propose a target-free approach for dengue drug discovery based on a novel, rapid, and economic *in situ* enzyme-linked immunosorbent assay. The *in situ* ELISA was standardized and validated for Huh7.5 cell line infected with all four serotypes of DENV, among them clinical isolates and laboratory adapted strains. Statistical analysis showed an average S/B of 7.2 and Z-factor of 0.62, demonstrating assay consistency and reliability. A panel of fifteen seaweed extracts was then screened at the non-toxic dose previously determined by the MTT and Neutral Red cytotoxic assays. Eight seaweed extracts were able to reduce DENV infection of at least one tested serotype. Four extracts (*Phaeophyta*: *Canistrocarpus cervicornis*, *Padina gymnospora*; *Rhodophyta*: *Palisada perforata*; *Chlorophyta*: *Caulerpa racemosa*) were chosen for further evaluation, and time of addition studies point that they might act at an early stage of the viral infection cycle, such as binding or internalization. Furthermore, the antiviral screening of 49 synthetic chemical compounds was performed, and eight anthraquinones showed anti- dengue activity in Huh7.5 cell lineage and were tested in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. Treatment with TAC02, TAC12 and LSF23 were able to diminish a percentage of infected cells to levels compared to IFN- α 2A, used as a reference compound. Here we presented a reliable, low cost and easy to perform method for the screening of anti-DENV activity compounds, showing promising results starting from natural products and synthetic chemical compounds.

Key- words: dengue virus, antiviral, *in situ* ELISA, seaweed extracts, synthetic chemical substances, anthraquinone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Países e áreas de risco de transmissão de dengue.....	16
Figura 2 – Ciclos de transmissão do vírus da dengue, seus vetores e hospedeiro. 17	
Figura 3 – Municípios brasileiros infestados por <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 4 – Incidência de casos prováveis de dengue (barras cinza) e o número de hospitalizações.	20
Figura 5 – Vigilância da circulação viral em 442 municípios brasileiros em 2013... 21	
Figura 6 – Organização genômica do vírus da dengue e identificação das proteínas estruturais e não estruturais.	22
Figura 7 – Ciclo de replicação do vírus da dengue.....	24
Figura 8 – Progressão da dengue.	26
Figura 9 – Estrutura química da substância 1,4-dihidroxi-antraquinona.....	46
Figura 10 – Padronização do ensaio de <i>in situ</i> ELISA.....	54
Figura 11 – Padronização do ensaio de <i>in situ</i> ELISA.....	55
Figura 12 – Validação do ensaio de <i>in situ</i> ELISA.....	56
Figura 13 – Curva dose-resposta para o composto controle IFN- α 2A	57
Figura 14 – Validação do ensaio de <i>in situ</i> ELISA.....	58
Figura 15 – Fluxograma do ensaio <i>in situ</i> ELISA.....	58

Figura 16 – Fluxograma para o processo de triagem antiviral e busca pelo modo de ação das substâncias mais promissoras (<i>hits</i>).	59
Figura 17 – Comparação entre os ensaios de VN (A) e MTT (B) realizados de forma isolada e combinada.	61
Figura 18 – Relação entre o valor de DO e o número de células inicial por poço... 61	
Figura 19 – Triagem dos extratos de macroalgas marinhas pelo ensaio de <i>in situ</i> ELISA.	64
Figura 20 – Inibição da infecção por diferentes cepas/sorotipos de DENV.	65
Figura 21 – Ensaio de tempo de adição com os extratos A1, A3, A8 e A12.	66
Figura 22 – Curva concentração resposta para os extratos A1, A3, A8 e A12.	67
Figura 23 – Ensaio virucida.	68
Figura 24 – Representação esquemática dos ensaios de adsorção (A) e internalização (B).	69
Figura 25 – Triagem da atividade antiviral do painel de substâncias químicas sintéticas.	72
Figura 26 – Curva de concentração resposta das 15 substâncias sintéticas selecionadas como <i>hits</i>	73
Figura 27 – Ensaio de apoptose em culturas de PBMC tratadas durante e após a infecção pelo DENV-4/TVP360.	75
Figura 28 – Ensaio de infecção em culturas de PBMCs tratadas durante e após a infecção pelo DENV-4/TVP360.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa de casos de dengue (aparente e não aparente) em 2010 distribuídos por continente.....	18
Tabela 2 – Situação do desenvolvimento de candidatos a vacina para dengue até 2011.....	30
Tabela 3 – Série de substâncias com potencial anti-dengue estudadas nos últimos 10 anos.....	35
Tabela 4 – Lista das macroalgas marinhas que deram origem aos extratos e seus locais de coleta	62
Tabela 5 – Concentração não citotóxica e CC_{50} dos extratos de alga avaliados pelos ensaios de MTT e VN.....	63
Tabela 6 – Concentração não citotóxica e CC_{50} das 49 substâncias químicas sintéticas avaliadas pelos ensaios de MTT e VN	70
Tabela 7 – CI_{50} e IS das 15 substâncias sintéticas selecionadas.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4G2	–	anticorpo monoclonal de camundongo anti-proteína envelope do gênero <i>Flavivirus</i>
7-AAD	–	7-aminoactinomicina D
µg	–	micrograma
µM	–	micromolar
µL	–	microlitro
ADE	–	teoria dos anticorpos potencializadores da infecção, do inglês <i>Antibody-dependent Enhancement</i>
ANOVA	–	análise de variância
C	–	capsídeo
CC₅₀	–	concentração tóxica para 50% da cultura celular
CCR	–	curva de concentração resposta
cDNA	–	ácido desoxirribonucleico complementar ao RNA-molde
CI₅₀	–	concentração inibitória em 50%
CMC	–	carboximetilcelulose
CNT	–	concentração não-tóxica
DENV	–	vírus da dengue
DMSO	–	dimetilsulfóxido
E	–	envelope
ELISA	–	ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	–	separação celular por fluorescência, do inglês <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FD	–	febre da dengue
FHD	–	febre hemorrágica da dengue
h	–	hora
HRP	–	enzima peroxidase de rabanete, do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
IgG	–	imunoglobulina G
IgM	–	imunoglobulina M
IFN-α 2A	–	interferon-alfa humano recombinante

IS	–	índice de seletividade
kB	–	quilobase
M	–	membrana
MOI	–	multiplicidade de infecção, do inglês <i>multiplicity of infection</i>
mM	–	milimolar
mg	–	miligrama
min	–	minuto
mL	–	mililitro
MTT	–	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NS	–	proteína não-estrutural
nm	–	nanômetro
pré-M	–	proteína precursora de membrana
PCR	–	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBMC	–	células mononucleares de sangue periférico, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	–	tampão salina fosfato, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
RE	–	Retículo endoplasmático
RNA	–	ácido ribonucleico
RNase A	–	enzima ribonuclease A
S/B		ruído de fundo, do inglês <i>signal to background</i>
seg	–	segundos
SCD	–	síndrome de choque da dengue
SFB	–	soro fetal bovino
TB	–	tampão de bloqueio
TMB	–	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
UFF	–	unidade formadora de foco
VN	–	vermelho neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A DENGUE	16
1.2 O VÍRUS	21
1.3 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA.....	24
1.4 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA DENGUE.....	27
1.4.1 Controle do mosquito vetor.....	27
1.4.2 Vacinas	28
1.4.3 Antivirais	30
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 LINHAGENS DE CÉLULAS E VÍRUS	42
3.2 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE FOCO.....	42
3.3 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO EM CÉLULA (<i>in situ</i> ELISA)	43
3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	44
3.5 COLETA E EXTRAÇÃO QUÍMICA DE ALGAS MARINHAS.....	45
3.6 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SINTÉTICAS	46
3.7 TRIAGEM ANTIVIRAL CONTRA O DENV	46
3.8 ENSAIO DE TEMPO DE ADIÇÃO.....	47
3.9 CURVA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA.....	47
3.10 ENSAIO DE ADSORÇÃO E INTERNALIZAÇÃO	48
3.11 ENSAIO VIRUCIDA.....	48
3.12 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	49
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	52
4.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA TRIAGEM ANTIVIRAL.....	52
4.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	60
4.3 TRIAGEM ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE MACROALGAS MARINHAS	62

4.4 TRIAGEM ANTIVIRAL DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	70
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DENGUE

A dengue é a doença viral transmitida por mosquitos de maior impacto em saúde pública no mundo. É um problema que transcende fronteiras geográficas, sendo endêmica em mais de 100 países entre regiões tropicais e subtropicais do planeta (BHATT *et al.*, 2013; OMS, 2009) (Figura 1).

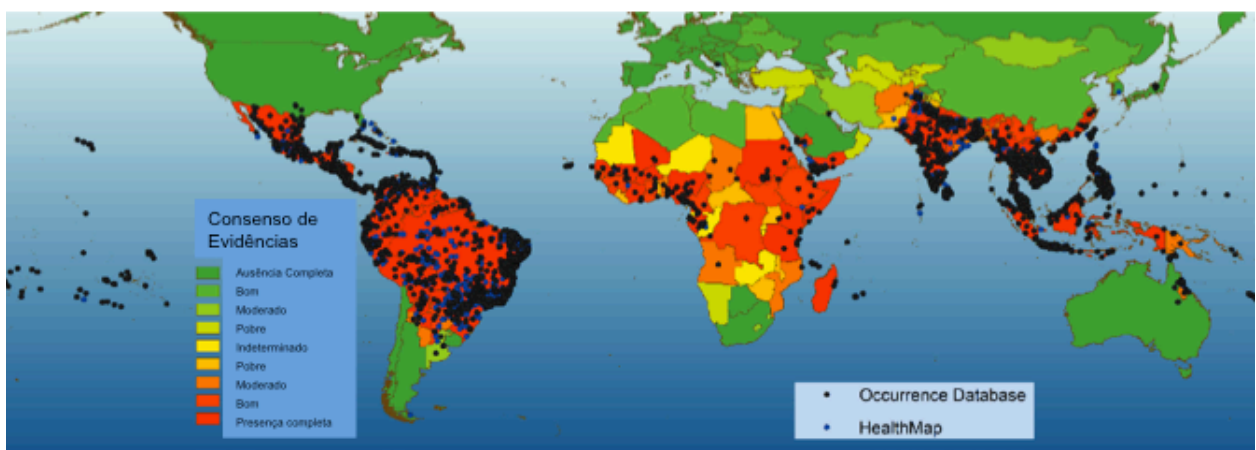


Figura 1 – Países e áreas de risco de transmissão de dengue. A cor dos países é baseada no consenso de ausência completa de dengue em verde até um consenso de presença completa de dengue em vermelho. Fonte: Modificado de Bhatt *et al.*, (2013).

Os primeiros investigadores da doença sugeriram que o vírus da dengue (DENV) seria transmitido por mosquitos, mas a transmissão real por um verdadeiro vetor não foi demonstrada até 1906 (BANCROFT¹, 1906 *apud* HENCHAL; PUTNAK, 1990). Em ambientes urbanos o DENV é transmitido entre hospedeiros humanos pelo mosquito vetor peridomiciliar *Aedes aegypti*. Entretanto, estudos de ecologia em habitats silvestres no oeste da África e Malásia identificaram ciclos de transmissão envolvendo primatas não humanos como reservatórios e os mosquitos

¹ BANCROFT, T. L. On the aetiology of dengue fever. **Aust. Med. Gaz.** v.25, p.17-18, 1906.

que habitam fendas de árvores, *Aedes (Stegomyia)* spp., como vetores (WEAVER; BARRETT, 2004). O ciclo de transmissão mais importante do ponto de vista de saúde pública é o urbano endêmico/epidêmico em grandes centros urbanos dos trópicos (GUBLER, 1998) (Figura 2).

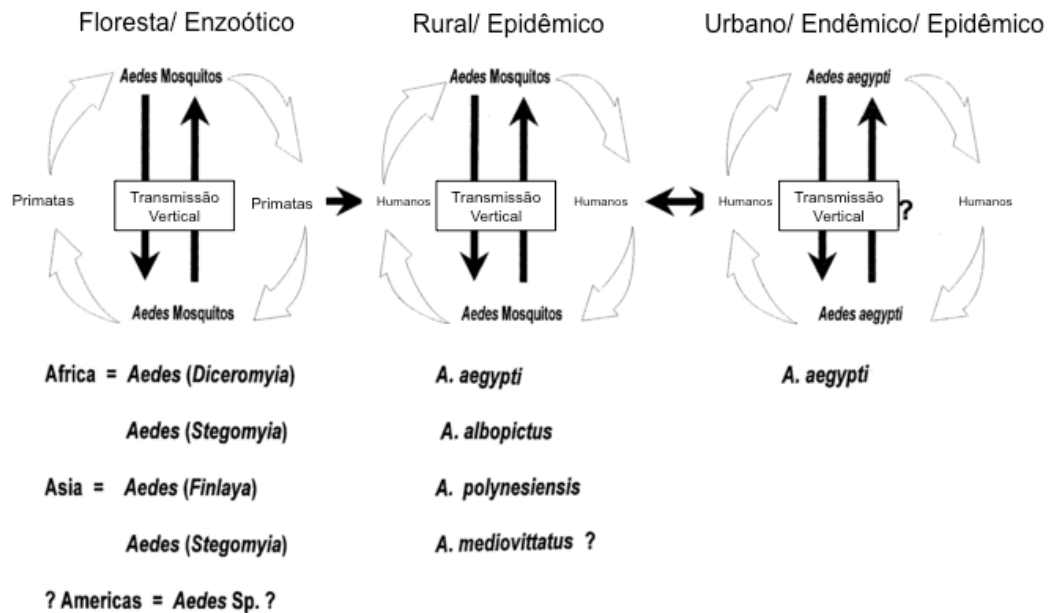


Figura 2 – Ciclos de transmissão do vírus da dengue, seus vetores e hospedeiros. Fonte: Modificado de Gubler (1998).

Uma vez que um indivíduo foi picado por um mosquito fêmea infectado com o vírus, inicia-se um período de incubação que pode durar de 3 a 14 dias, após o qual a pessoa pode sofrer de febre aguda acompanhada de diversos sintomas e sinais não específicos. Durante este período febril agudo, que pode durar de 2 a 10 dias, o DENV pode circular no sangue periférico. Caso outro mosquito se alimente de uma pessoa doente neste período, este poderá tornar-se infectado e após 8 a 12 dias estará apto a transmitir o vírus para outras pessoas, completando o ciclo de transmissão (GUBLER, 1998).

Até recentemente estimava-se que dois quintos da população mundial encontravam-se em áreas de risco de infecção e que 50 milhões de novos casos e 25 mil mortes ocorreriam anualmente (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005; OMS,

2009). Entretanto um novo mapeamento da distribuição global e risco de dengue estima que 390 milhões de infecções ocorram anualmente, das quais 96 milhões manifestam-se em algum nível de comprometimento da saúde do indivíduo pela doença (casos aparentes) (BHATT *et al.*, 2013), sendo que a maior parte dos casos estaria concentrada na Ásia (Tabela 1).

Tabela 1 – Estimativa de casos de dengue (aparente e não aparente) em 2010 distribuídos por continente.

	Aparente (Milhões)	Não Aparente (Milhões)
África	15,70	48,40
Ásia	66,80	204,40
Américas	13,30	40,50
Oceania	0,18	0,55
Global	96,00	293,90

Fonte: Modificado de Bhatt *et al.*, (2013).

Recentemente, o impacto econômico total da doença nas Américas foi estimado em 2,1 bilhões de dólares ao ano, em média (SHEPARD *et al.*, 2011). No entanto, este valor é provavelmente subestimado devido a um grande número de casos não confirmados laboratorialmente e subnotificação.

A dengue nas Américas possui um padrão endêmico-epidêmico com surtos a cada 3 a 5 anos. Dick *et al.* (2012) revisaram a história dos surtos nas Américas, dividindo-a em quatro períodos:

1) Introdução da doença: de 1600 a 1946, inicialmente com epidemias de doenças parecidas com dengue, mas sem informações clínicas detalhadas que pudessem confirmá-las. Após 1943 com o isolamento do vírus pela primeira vez e a disponibilidade de testes diagnósticos, iniciou-se a era moderna de pesquisa com o DENV.

2) Plano de erradicação do *Aedes aegypti*: entre 1947 e 1970, através de fumigação e a eliminação de focos de mosquitos, que obteve sucesso em 18 países continentais e diversas ilhas do Caribe.

3) Reintrodução e expansão da distribuição geográfica do *Aedes aegypti*: de 1971 a 1999, devido a eventual deterioração dos programas de controle de vetores, levando a surtos causados por diferentes sorotipos do vírus.

4) Dispersão do mosquito: de 2000 até os dias atuais houve o aumento da dispersão do mosquito e da circulação dos quatro sorotipos do vírus, com um aumento no número de casos sem precedentes, assim como a maior incidência de casos graves.

Entre os possíveis motivos apontados como responsáveis pelo aumento do número de casos da doença, estão o grande crescimento da população mundial, associada à urbanização descontrolada e não planejada, aumento de viagens aéreas (WILDER-SMITH; GUBLER, 2008), decaimento da infraestrutura da saúde pública e a falta de controle efetivo de mosquitos em regiões onde a dengue é endêmica. Por exemplo, dados do Portal da Saúde do Ministério da saúde (2013) mostram que no Brasil o número de municípios infestados com *Aedes aegypti* aumentou de 1.753 para 4.007, de 1995 a 2010 (Figura 3).

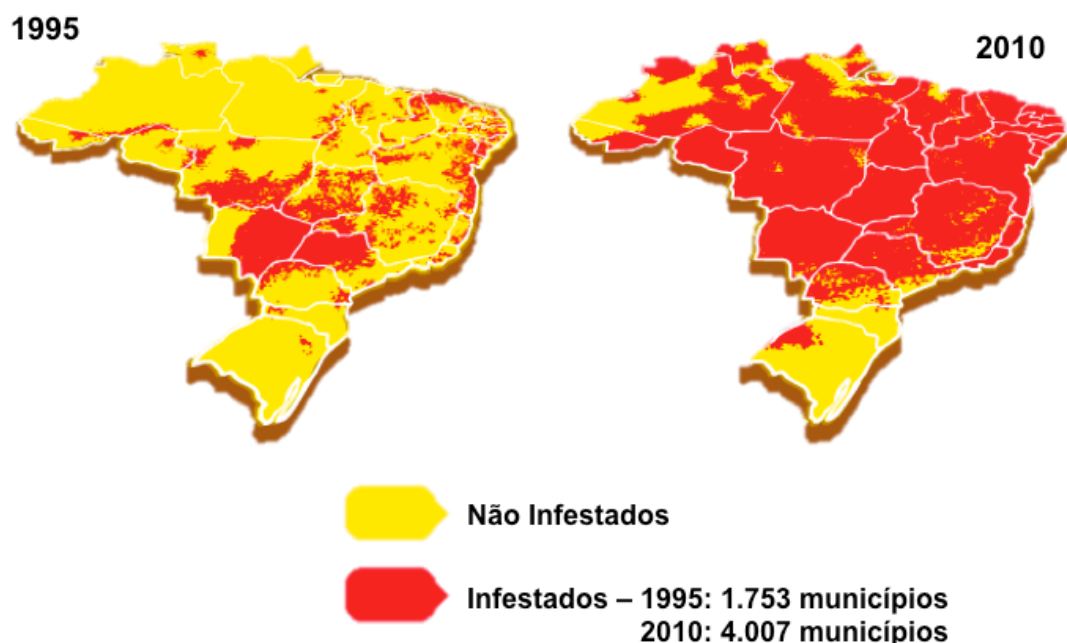


Figura 3 – Municípios brasileiros infestados por *Aedes aegypti*. Fonte: Secretaria de vigilância em saúde (2013).

No Brasil, nos últimos 20 anos, cinco grandes epidemias foram registradas (Figura 4), todas associadas a mudança do sorotipo viral predominante, sendo em 1998 (sorotipo 1), 2002 (sorotipo 3), 2008 (sorotipo 2) e 2010 (sorotipo 1) (Ministério da saúde, 2013). Em 2010, o estado do Roraima notificou o primeiro caso suspeito de dengue tipo 4, 28 anos após este sorotipo ter circulado no país (NUNES *et al.*, 2012; TEMPORÃO *et al.*, 2011), levando a última epidemia registrada em 2013.

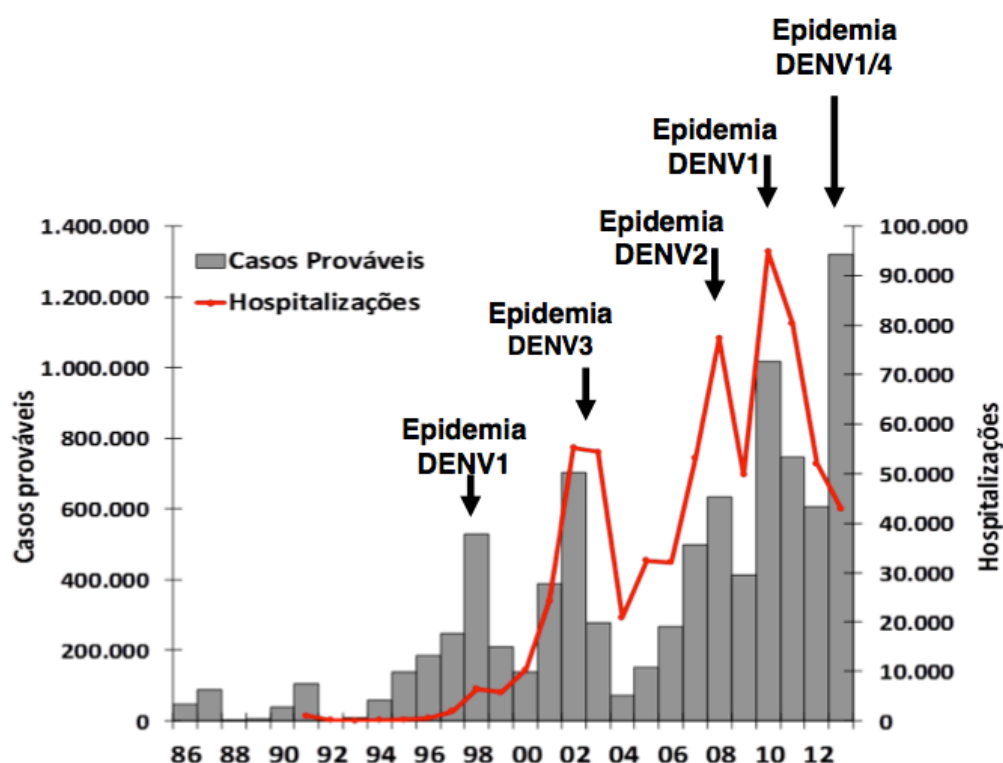


Figura 4 – Incidência de casos prováveis de dengue (barras cinza) e o número de hospitalizações (linha vermelha) no Brasil desde a reintrodução da doença em 1986. As cinco grandes epidemias registradas nesta época estão indicadas. Fonte: Secretaria de vigilância em saúde (2013).

Em 2013, foram notificados 1.476.917 casos suspeitos de dengue entre as semanas epidemiológicas 1 e 42, um aumento de 54,6% em relação ao mesmo período de 2010, sendo registrados 573 óbitos pela doença. Dados de vigilância da circulação viral em 442 municípios brasileiros mostraram que os quatro sorotipos circularam no país, sendo que o sorotipo 4 circulou em 71,9% dos municípios,

seguido do sorotipo 1 em 46,6%, sorotipo 2 em 6,8% e o sorotipo 3 em 2,9% (Ministério da saúde, 2013) (Figura 5).

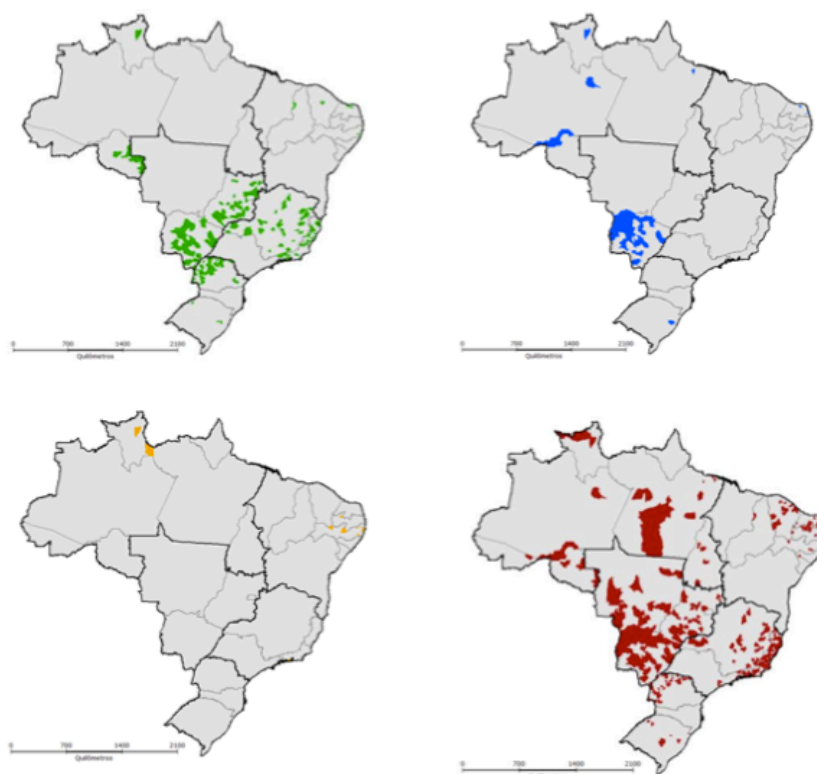


Figura 5 – Vigilância da circulação viral em 442 municípios brasileiros em 2013. DENV-1 em verde, DENV-2 em azul, DENV-3 em laranja e DENV-4 em vermelho. Fonte: Secretaria de vigilância em saúde (2013).

1.2 O VÍRUS

A febre da dengue foi a segunda doença humana (após a febre amarela) a qual a etiologia foi criticamente identificada como “vírus filtrável”, e que após 1944 foi extensivamente estudada em laboratório. Utilizando soro infeccioso e a transmissão por mosquito, Sabin e seus colaboradores realizaram diversas descobertas notáveis com relação ao espectro de sintomas clínicos observados após a infecção experimental, o tamanho da partícula do vírus, as vias de infecção, competência do vetor, estabilidade e sensibilidade do vírus a agentes desnaturantes, a susceptibilidade de alguns animais hospedeiros para a infecção, indução e duração de proteção imune após a infecção, e a interferência por vírus heterólogos, revisado por Henchal e Putnak (1990).

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e inclui quatro sorotipos distintos (DENV-1, -2, -3 e -4), que variam em suas sequências genéticas em aproximadamente 30% e são capazes de causar os mesmos sintomas. Além do DENV, outros *Flavivirus* são patógenos importantes ao ser humano, incluindo o vírus do oeste no Nilo, o vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Os vírions de dengue apresentam genoma de RNA fita simples de polaridade positiva, envolto por um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica, além do envelope e proteínas (HENCHAL; PUTNAK, 1990; LAI; PUTNAK, 2007).

O genoma viral de aproximadamente 11 Kb possui um CAP na extremidade 5' e a extremidade 3', não poliadenilada, formando uma estrutura em grampo. O genoma inteiro é traduzido em uma poliproteína precursora que quando clivada co- e pós- traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro, gera três proteínas estruturais: capsídeo, precursora da proteína de membrana e envelope (C, prM e E, respectivamente), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990) (Figura 6).

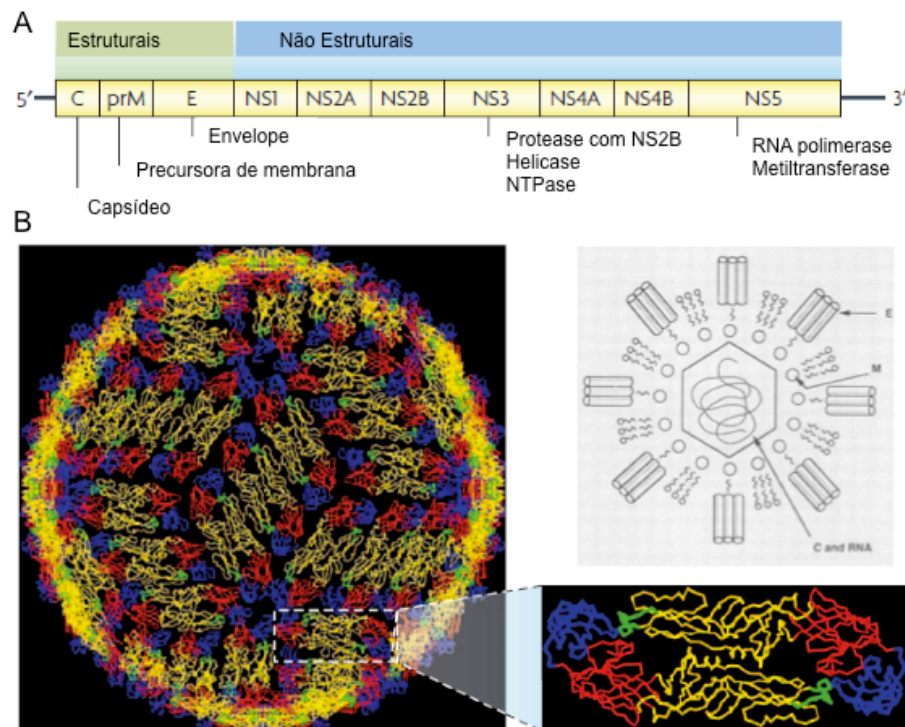


Figura 6 – Organização genômica do vírus da dengue e identificação das proteínas estruturais e não estruturais (A). Representação de vírions, com ênfase ao envelope protéico formado por dímeros da proteína E (B). Fonte: Modificado de Henchal e Putnak, 1990; Whitehead *et al.*, 2007.

O ciclo de replicação do DENV inicia-se com a ligação do vírus a um receptor celular, ainda não totalmente elucidado, e a internalização através de endocitose mediada por clatrina para o interior da célula hospedeira. Durante essa etapa, ocorre a diminuição do pH do endossoma levando a rearranjos conformacionais da glicoproteína E que conduz à fusão das membranas do vírus e do endossoma, liberando o RNA viral no citoplasma da célula (MODIS *et al.*, 2004). O genoma viral atua como RNA mensageiro e é diretamente traduzido em uma única poliproteína que é processada dando origem às proteínas estruturais e não estruturais (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). As proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação do RNA viral em complexos de replicação associados a membranas celulares. Também agem interferindo em vias da resposta imune inata, como por exemplo a protease NS2b/NS3 que cliva STING/MITA interferindo na indução de IFN- α/β ; NS2a/NS4a e NS4b bloqueiam a fosforilação de STAT1 e NS5 degrada STAT2 (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). O RNA recém sintetizado e proteínas do capsídeo são envelopados pelas glicoproteínas prM e E para montagem das partículas imaturas que brotam do retículo endoplasmático (RE). Estas são então transportadas através da rota secretória do complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da proteína prM mediada por furinas, levando a maturação do vírus e novamente a um rearranjo do revestimento glicoprotéico. A partícula madura é então liberada por meio de exocitose, ao mesmo tempo em que incorpora parte da bicamada lipídica celular à sua estrutura (Figura 7).

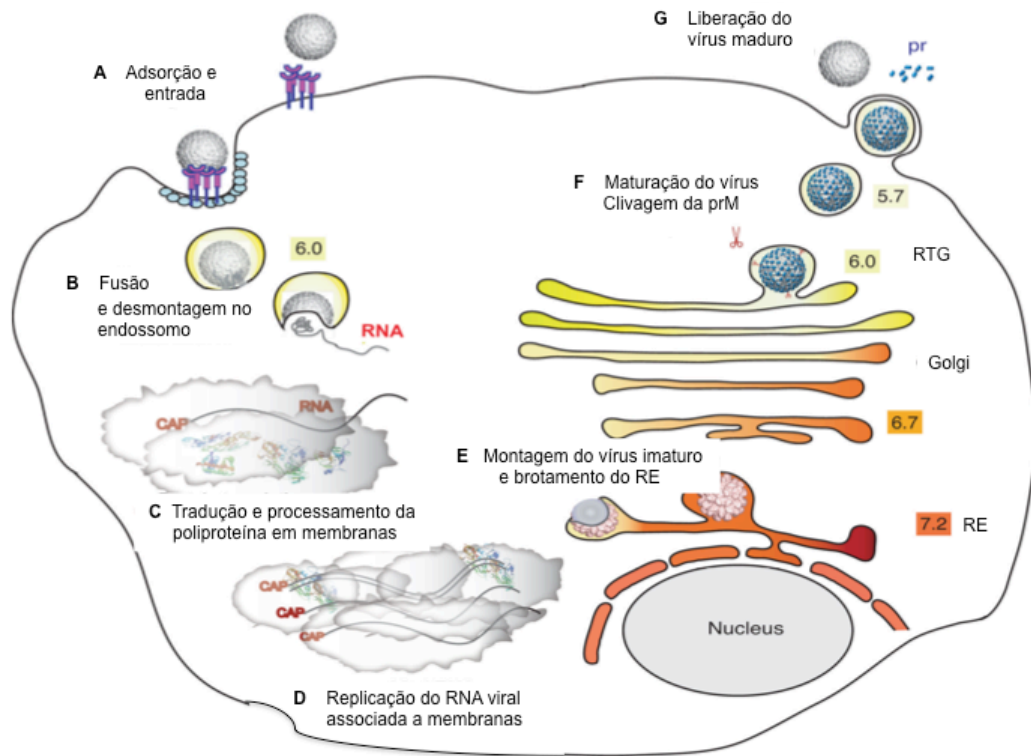


Figura 7 – Ciclo de replicação do vírus da dengue. O vírus entra na célula por endocitose mediada por receptores (A), resultando na liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (B). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada em membranas (C), e replicado via uma fita de RNA negativo intermediária que serve como molde para a produção de RNA genômico (D). As partículas virais são montadas nas membranas do retículo endoplasmático (E), sofrem maturação (F) e são transportadas através da via secretória da célula hospedeira, liberadas por exocitose (G). O pH dos compartimentos celulares estão indicados. Fonte: Modificado de Perera; Khaliq e Kuhn (2008).

1.3 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA

As manifestações clínicas da infecção pelo DENV variam de uma febre indiferenciada (febre da dengue- FD) a formas mais severas, algumas vezes fatais caracterizadas pela febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque da dengue (SCD). Dados epidemiológicos mostram um aumento de casos de FHD e SCD assim como em casos atípicos severos, com o comprometimento do fígado e do sistema nervoso central (CAROD-ARTAL *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2013).

A gravidade da doença pode estar relacionada a diferentes fatores. Alguns autores sugerem que mecanismos imunopatológicos desempenhariam um importante papel no desenvolvimento da FHD/SCD (NIELSEN, 2009), pois uma

maior incidência de FHD é observada após uma infecção secundária por um segundo sorotipo de DENV, possivelmente decorrente do fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção (*antibody dependent-enhancement* – ADE) (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; MALAVIGE *et al.*, 2004). Ou ainda da expansão predominante de células T com baixa avides para o sorotipo viral infectante e alta avides para o sorotipo de infecções prévias (fenômeno conhecido como pecado antigênico original) (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003). Dessa forma a patogênese da doença grave seria direcionada por uma resposta imune exacerbada resultando na liberação de citocinas pró- inflamatórias e, conseqüentemente, extravasamento vascular.

Entretanto a ocorrência de FHD/SCD e óbitos a partir de infecções primárias sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos, como variantes virais com um maior potencial patogênico, maior competência de mosquitos vetores, fatores genéticos e estado imunológico do hospedeiro (LEITMEYER *et al.*, 1999; MANGADA; IGARASHI, 1998; RICO-HESSE *et al.*, 1997). O aumento na replicação viral e na quantidade de células infectadas com o vírus foi relacionado à doença severa, com viremia de 10 a 100 vezes mais altas em pacientes com FHD quando comparada a pacientes com FD (VAUGHN *et al.*, 2000).

A infecção pelo DENV causa uma doença sistêmica e dinâmica. Após o período de incubação, a doença começa abruptamente e é seguida de três fases: febril, crítica e de recuperação (Figura 8). A fase febril usualmente dura de 2 a 7 dias e é frequentemente acompanhada por rubor facial, eritema cutâneo, dor generalizada pelo corpo, mialgia e dor de cabeça. Esses sintomas gerais dificultam a distinção de outras doenças febris. Nestes casos o exame de prova do laço positivo indica a probabilidade de ser dengue (OMS, 2009).

A fase crítica inicia-se com a defervescência, quando a temperatura corporal cai para 37,5°C ou menos, usualmente entre o terceiro e sétimo dia de doença, e um aumento na permeabilidade capilar em paralelo com aumento nos níveis de hematócrito podem ocorrer. O período de extravasamento de plasma dura entre 24 e 48 horas, e o choque hipovolêmico ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido. No período de recuperação ocorre a reabsorção gradual do fluido extravascular (OMS, 2009).

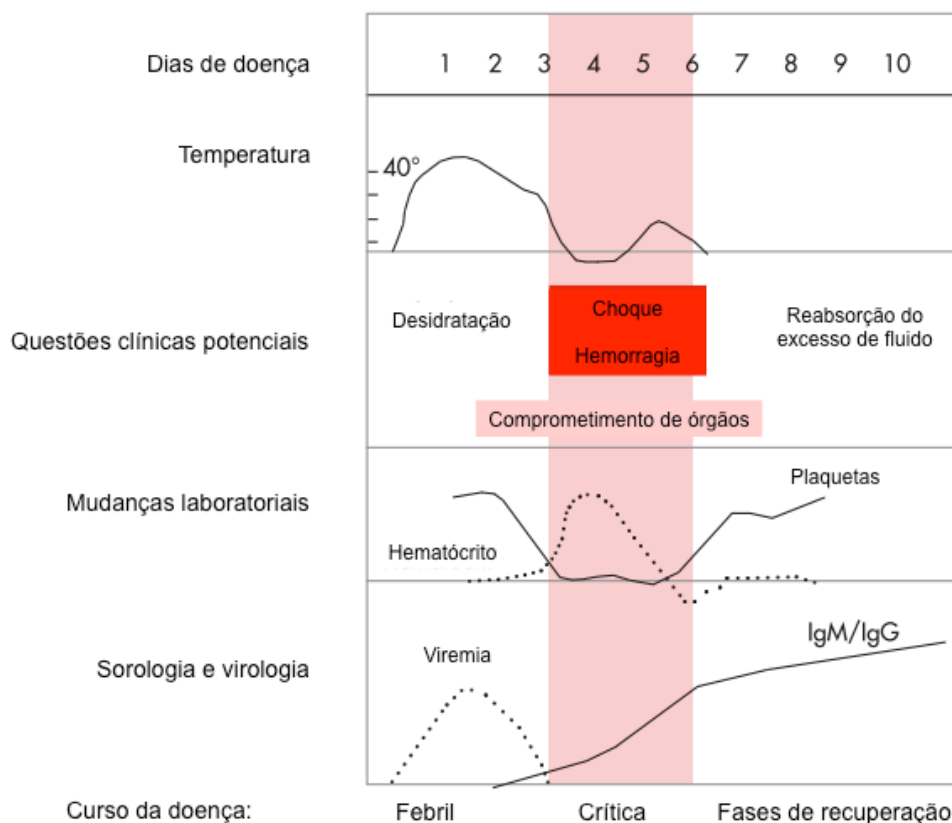


Figura 8 — Progressão da dengue. Doença clínica, temperatura, parâmetros hematológicos, parâmetros de sorologia e viremia. Modificado de OMS, 2009.

A identificação precoce dos casos de dengue é de vital importância para a tomada de decisões e implantação de medidas adequadas, visando principalmente evitar a ocorrência de óbitos. Segundo indicações do Ministério da Saúde, considera-se caso suspeito de dengue todo paciente que apresentar doença febril aguda, acompanhada por pelo menos dois dos sinais ou sintomas como cefaléia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, associados ou não à presença de sangramentos ou hemorragias, com história epidemiológica positiva, tendo estado nos últimos 15 dias em área com transmissão de dengue ou que tenha a presença do mosquito *Aedes aegypti* (Ministério da saúde, 2013).

De acordo com o grupo de risco, exames laboratoriais são indicados para a confirmação da doença. Entre eles, exames específicos usualmente realizados em laboratórios de referência, como ELISA para detecção de IgM (costuma positivar após o sexto dia da doença), ELISA para detecção de IgG (costuma positivar a partir do nono dia de doença, na infecção primária, e já ser detectável desde o primeiro dia

da doença na infecção secundária); e ensaios para a detecção de vírus ou antígenos virais, como isolamento viral, RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), imuno-histoquímica, e NS1 (Ministério da saúde, 2013).

1.4 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA DENGUE

Apesar do importante impacto social e clínico da dengue, atualmente o combate à doença depende essencialmente do controle do mosquito vetor e da disponibilidade de serviços de diagnóstico nas áreas de transmissão. O tratamento é de suporte para o alívio dos sintomas (antitérmicos e hidratação), já que não existem vacinas aprovadas para a prevenção da dengue e/ou terapias antivirais específicas para o tratamento da doença.

1.4.1 Controle do mosquito vetor

Atividades de controle da transmissão da dengue deveriam ter como alvo o *Aedes aegypti* em habitats dos seus estágios imaturos e adultos nas casas e imediações onde o contato humano-vetor ocorre. Uma das formas de controle é a gestão ambiental que busca mudanças no ambiente para prevenir ou minimizar a propagação do vetor, destruindo e removendo recipientes que proporcionam habitats para larvas. Outra opção é o controle químico, com o uso de larvicidas e adulticidas (OMS, 2009). Na década de 1970, o uso do DDT resultou em uma redução considerável na população de mosquitos e consequentemente uma queda na transmissão da doença.

O controle biológico também pode ser uma alternativa, baseado na introdução de organismos que se alimentam, parasitam ou compitam com o mosquito. Algumas espécies de peixes e pequenos crustáceos (*Copepoda*) mostraram-se eficazes em habitats específicos (OMS, 2009). Estudos de Nam *et al.* (2012) descrevem uma estratégia de controle do mosquito baseado na introdução de

Mesocyclops sp. em contêineres de água, que resultou na eliminação do *Aedes aegypti* em 40 das 46 comunidades estudadas no Vietnã.

Novas abordagens para o controle de vetores envolvem o uso de mosquitos modificados por engenharia genética que carregam um gene letal dominante. Por exemplo, a cepa transgênica de mosquitos machos OX3604C foi projetada para ter um fenótipo repressivo na prole de mosquitos fêmeas, na tentativa de controlar a transmissão de DENV por suprimir a população do vetor, com resultados bastante positivos em ambiente laboratorial (WISE DE VALDEZ *et al.*, 2011).

Outra opção proposta para o controle da transmissão de dengue tem como alvo a redução da longevidade do mosquito ao invés de sua abundância, através da introdução da cepa de bactéria *Wolbachia* sp. em populações de *A. aegypti*. A *Wolbachia* é uma bactéria intracelular que infecta naturalmente mais de 60% das espécies de insetos pelo mundo, entretanto mosquitos *A. aegypti* não são naturalmente infectados. Inesperadamente foi descoberto que essa bactéria, além do efeito citado anteriormente, também é capaz de inibir diretamente a capacidade de o DENV infectar esta espécie de mosquito, diminuindo a competência do vetor em transmitir a doença (MOREIRA *et al.*, 2009).

1.4.2 Vacinas

O desenvolvimento de uma vacina para dengue tem sido alvo de estudo no decorrer dos últimos 60 anos, e tem sido prioridade para a Organização Mundial da Saúde por mais de três décadas. Entre os grandes desafios encontrados estão a necessidade de estabelecer uma resposta imune protetora, balanceada e duradoura contra os quatro sorotipos do vírus e ao mesmo tempo evitar gerar respostas imunes prejudiciais ou exacerbadas. Ainda, a vacina deve ser econômica, já que a maioria dos locais que enfrentam surtos endêmicos são países em desenvolvimento (MURRELL; WU; BUTLER, 2011).

Quatro tipos de vacinas para dengue estão em desenvolvimento. 1) As vacinas com vírus atenuado são capazes de induzir resposta imune celular e humoral, por mimetizar uma infecção natural. Para isso, o vírus deve estar suficientemente atenuado e possuir baixa viremia para que não ocorra a transmissão

por mosquitos. 2) A vacina quimérica viva atenuada utiliza a estrutura genômica de um vírus com a substituição de pequenas partes por genes de outros vírus. 3) A vacina com o vírus inativado, requer múltiplas doses e a imunidade relativamente curta a torna menos atraente quando comparada às outras opções. 4) As vacinas de DNA possuem vantagens em termos de fácil produção, estabilidade, transporte, diminuição da probabilidade de interferência na replicação, e possibilidade de vacinação contra múltiplos patógenos de uma só vez, entretanto também necessitam de múltiplas doses e não são econômicas (WILDER-SMITH *et al.*, 2010). A tabela 2 mostra os candidatos a vacinas para dengue mais promissores e que estão em fase de testes clínicos.

Tabela 2 – Situação do desenvolvimento de candidatos a vacina para dengue até 2011.

Tipo de Vacina	Desenvolvida por	Colaborador	Método	Situação
Vírus vivo atenuado (VVA)	Universidade Mahidol, Tailândia	Sanofi Pasteur	Cepas atenuadas de DENV por passagens seriadas em células de rim de cachorro, de macaco verde africano e macacos rhesus	Fase II completa
	Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), EUA	GlaxoSmithKline (GSK)	VVA tetravalente por passagens seriadas em células de rim de cachorro	Fase II
	National Institutes of Health (NIH), National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Laboratory of Infectious Diseases (LID), EUA	Biological E, Panacea Biotech, Butantan, Vabiotech	Utiliza genética reversa com a deleção de 30 nucleotídeos na região 3' não traduzida do genoma dos quatro sorotipos de DENV	Fase I/ II
Vírus quimérico vivo	Center for Disease Control (CDC), EUA	InViragen	Utiliza genes das proteínas estruturais de DENV-1, -3 e -4 no genoma atenuado de DENV-2 PDK53	Fase I
	Acambis, EUA (adquirido pela Sanofi Pasteur em 2008)	Sanofi Pasteur	Utiliza a cepa vacinal de febre amarela (FA) 17D como estrutura genômica, substituindo as sequências correspondentes a proteína M e E do FA com as sequências dos quatro sorotipos de DENV (ChimeriVax- DEN1-4)	Fase III
Recombinante, DNA e subunidades	Naval Medical Research Center, EUA		Genes de DENV são inseridos em um vetor de adenovírus que não replica. O vetor expressa as proteínas recombinantes prM e E de DENV-1 -2, -3 e -4	Fase I
	Hawaii Biotech Inc., EUA	Merck	Utiliza 80% da proteína E de cada sorotipo de DENV e a NS1 inteira de DENV-2, formulada em um adjuvante exclusivo	Pré-clínico

Fonte: Modificado de Murrell *et al.*, 2011.

1.4.3 Antivirais

Estudos mostram que pacientes com um maior pico de viremia estão mais propensos a desenvolver dengue severa, sugerindo que a redução dos níveis virais por meio da terapia antiviral durante fases iniciais da infecção poderiam prevenir ou diminuir as chances dos pacientes progredirem para a FHD ou SCD (LIM *et al.*, 2013).

Um medicamento anti-dengue seguro e eficiente deveria idealmente ter o potencial de reduzir o número total de pessoas que desenvolvem manifestações clínicas da doença e fornecer proteção para as pessoas que viajam para regiões onde a dengue é endêmica. Para isso, alguns requisitos devem ser cumpridos, como uma fácil rota de administração, estabilidade, vida útil longa e preços razoáveis. Com respeito a eficácia clínica, o fármaco deve ser ativo contra os quatro sorotipos do DENV e em infecções primárias e secundárias, com bom perfil de segurança (OMS, 2009).

Por ser uma doença aguda, com o período de viremia curto que persiste por aproximadamente de 3 a 4 dias, o tempo para a administração de antivirais seria breve. Dessa forma, o tratamento da dengue com agentes antivirais diretos teria como necessidade um tratamento similar ao do Influenza, ou seja, nas primeiras 48h de doença, e para isso o diagnóstico precoce é essencial.

Entretanto, alguns estudos (GUILARDE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2003, 2006) observaram a presença do DENV durante a fase de pós-defervescência em pacientes com dengue severa, o que poderia indicar que o tratamento antiviral poderia ser administrado em estágios tardios da doença e ainda ser benéfico. Além disso, em casos de regiões endêmicas, epidemias e surtos, os antivirais poderiam ser utilizados de forma profilática ou em casos de doenças febris de etiologia indeterminada.

O ponto de partida para uma campanha de triagem antiviral é a escolha do tipo de painel ou qual substância será estudada. Dentre as opções de moléculas com atividade anti-dengue estão inúmeras bibliotecas com milhões de pequenas moléculas sintéticas (VERHEIJ, 2006), anticorpos monoclonais modificados (WILLIAMS *et al.*, 2013) e RNA de interferência (IDREES; ASHFAQ; KHALIQ, 2013). Ainda, substâncias naturais, obtidas a partir de plantas e organismos marinhos, têm sido estudadas e algumas vezes apresentaram sucesso ao diminuir a viremia e/ou produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos *in vitro* e *in vivo* de infecção por diversos vírus, apresentando-se como possíveis alternativas para o tratamento de viroses (YASUHARA-BELL; LU, 2010).

Os produtos naturais oferecem um ponto de partida privilegiado na busca por moduladores de funções biológicas específicas e potentes, assim como novas drogas (HONG, 2011). O ambiente marinho em especial é de grande importância na biodiversidade do planeta. Estima-se que existam cerca de 8,7 milhões de espécies

eucarióticas no mundo, das quais aproximadamente 2,2 milhões são marinhas, oferecendo uma fonte quase infinita para novas substâncias (MORA *et al.*, 2011; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Os organismos marinhos são conhecidos produtores de agentes farmacológicos e antivirais e podem fornecer recursos biológicos ilimitados para a produção de drogas terapêuticas contra infecções virais em humanos. Compostos extraídos de algas marinhas possuem atividade *in vitro* e *in vivo* contra uma grande variedade de vírus, incluindo vírus herpes (HSV-1, HSV-2 e HCMV), Togavirus (vírus Sindbis, vírus Semliki Forest) Paramyxovirus (RSV), Rhabdovirus (VSV), e vírus da imunodeficiência humana e de símios (HIV e SIV) (YASUHARA-BELL; LU, 2010).

As múltiplas etapas no ciclo de infecção pelo DENV (Figura 7) como a adsorção do vírus, fusão de membranas, replicação, reação de capeamento, atividade de proteases, montagem da partícula e maturação são potenciais alvos para moléculas antivirais. As proteínas virais são de grande interesse por serem indispensáveis ao processo e não estarem presentes na célula hospedeira. Entretanto os alvos na célula hospedeira também são importantes por apresentarem-se em maior quantidade.

Alguns relatos demonstram possíveis inibidores para diferentes alvos da infecção pelo DENV como a adsorção e entrada (ALEN *et al.*, 2011; COSTIN *et al.*, 2010; HROBOWSKI; GARRY; MICHAEL, 2005; KAMPMANN *et al.*, 2009; KAPTEIN *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2009), proteína NS3 (DENG *et al.*, 2012; LESCAR *et al.*, 2008; MASTRANGELO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2011) replicação do RNA e tradução (CLEEF *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2009) ou processos do hospedeiro (SAYCE; MILLER; ZITZMANN, 2010). Yin *et al.*, (2009) caracterizaram um análogo de adenosina capaz de reduzir a viremia, a produção de TNF- α e IL-6, prevenindo a morte em camundongos infectados.

Nos últimos 10 anos, a busca por um antiviral contra o DENV vem se intensificando; entretanto apesar de inúmeras tentativas nenhum fármaco foi aprovado até o momento. Muitas substâncias que eram promissoras em modelo *in vitro* foram descontinuadas devido a suas propriedades farmacocinéticas ou ao seu desempenho quando testadas em modelo *in vivo*. A tabela 3 apresenta uma visão geral da busca por um agente anti-dengue nesse período. Por exemplo, NITD-448 apresentou fraca seletividade e propriedades farmacocinéticas devido a sua grande

massa molecular (POH *et al.*, 2009); o composto 6 mostrou baixa potência e alta atividade de ligação a proteínas do plasma em ensaio *in vivo* e apesar de esforços químicos não foi possível melhorar suas propriedades farmacocinéticas (WANG *et al.*, 2009). Para NITD-618, a alta lipofilicidade resultou em propriedades farmacocinéticas pobres que prejudicou os testes em camundongos e a tentativa de diminuir a lipofilicidade resultou em perda de atividade antiviral (XIE *et al.*, 2011).

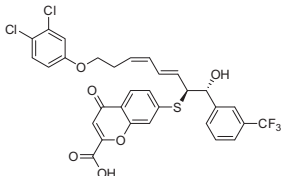
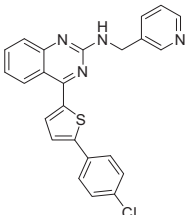
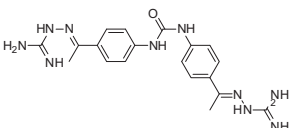
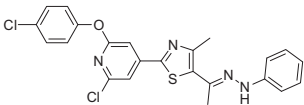
Algumas moléculas foram inclusive testadas em ensaios clínicos, mas não apresentaram bons resultados. Tricou *et al.* (2010) realizaram um ensaio clínico com cloroquina, que inibe a replicação de DENV *in vitro*, para o tratamento da dengue em adultos. Dos 307 pacientes hospitalizados com suspeita de dengue, a doença foi confirmada laboratorialmente em 257. O tratamento com a cloroquina não reduziu a duração da viremia e de NS1 nos pacientes com dengue e novos estudos devem ser realizados. Mais recentemente, Nguyen *et al.* (2013) realizaram um ensaio clínico randomizado e duplo cego com Balapiravir, um inibidor da replicação do vírus da hepatite C *in vivo*. Participaram do ensaio indivíduos adultos do sexo masculino, pacientes do Hospital para Doenças Tropicais no Vietnã, que apresentavam clínica suspeita de dengue e confirmação pelo teste rápido de NS1. A substância foi bem tolerada pelos pacientes, entretanto não melhorou os aspectos virológicos, imunológicos, ou clínicos da doença, mesmo com o início do tratamento nas primeiras 48h.

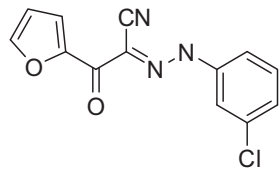
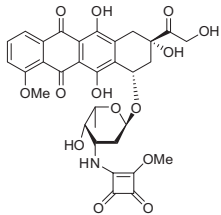
Apesar dos esforços não terem gerado um medicamento até o momento, acredita-se que o empenho contínuo irá levar a uma terapia anti-DENV eficaz em um futuro próximo (LIM *et al.*, 2013). Byrd *et al.* (2013b) identificaram um novo inibidor da replicação de DENV (ST-610) através da triagem de alto rendimento de uma biblioteca de moléculas que inibem o efeito citopático induzido pelo vírus, sendo ativo contra os quatro sorotipos do DENV e não tóxico para as células. Essa atividade antiviral foi independente do tipo celular, sugerindo que o ST-610 tem como alvo uma função específica do vírus, provavelmente a proteína NS3 (domínio helicase). Em testes *in vivo*, foi bem tolerado, sem a observação de efeitos adversos; e mostrou eficácia reduzindo significativamente a viremia dos animais tratados quando comparados aos controles. Está sendo realizada a otimização química desta molécula com foco na obtenção de análogos com melhor biodisponibilidade oral.

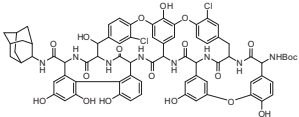
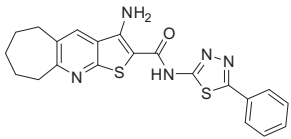
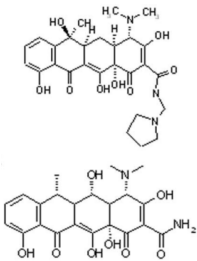
Outra substância promissora para o tratamento da dengue é o celgosivir (butil- castanospermina), uma pró-droga oral derivada do produto natural castanospermina, que inibe a alfa-glicosidase I, enzima que tem papel crítico atuando na maturação viral, iniciando o processamento de oligossacarídeos das glicoproteínas do envelope viral. Foi testado em ensaio clínico de fase II em combinação com IFN peguilado e ribavirina para o tratamento de HCV, e descontinuado por não apresentar resultados melhores que a droga de referência. Diversos estudos indicam que a castanospermina e o celgosivir inibem a replicação de DENV *in vitro* e *in vivo* (SCHUL *et al.*, 2007; WHITBY *et al.*, 2005). Baseado nestes resultados, um ensaio clínico de fase Ib está em andamento para avaliar a atividade antiviral, farmacocinética, segurança e tolerância em pacientes com dengue.

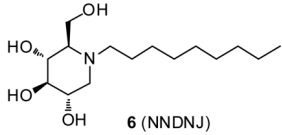
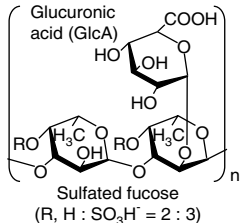
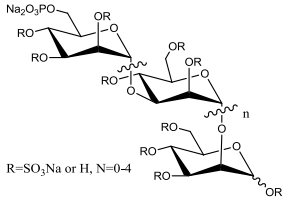
Diante do exposto, o presente estudo propõe a busca por substâncias com potencial anti-DENV adotando duas abordagens, a triagem de extratos naturais provenientes de macroalgas marinhas e substâncias químicas sintéticas, utilizando um método confiável e de fácil execução.

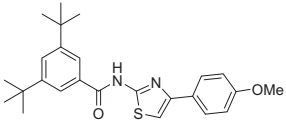
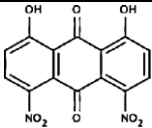
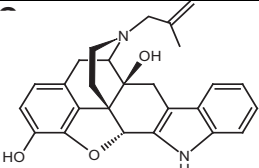
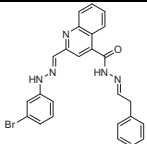
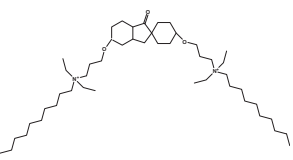
Tabela 3 – Série de substâncias com potencial anti-dengue estudadas nos últimos 10 anos.

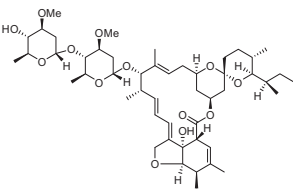
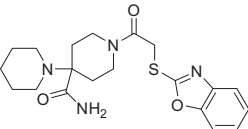
Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Confirmatório	Atividade Celular CI ₅₀ /CC ₅₀ (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
NITD-448		Ligação a dobra β OG da proteína envelope	Triagem virtual <i>in silico</i> de 2,4 milhões de moléculas. Ensaios de fusão de média e baixa escala.	9,8/48,7 μ M (Ensaio <i>CellTiter Glo</i>)	DENV-2/ TSV01 DENV-2/ NGC	BHK21	Poh <i>et al.</i> (2009)
Composto 6		Prende o DENV em vesículas e inibe a expressão de NS3	Triagem de larga escala de ancoragem em uma dobra hidrofóbica da proteína E. Ensaio celular de imunodeteção de Flavivirus.	0,119/>20 μ M (Ensaio <i>CellTiter Glo</i>)	DENV-1/ My97-10245 DENV-2/ NGC DENV-3/ My99-21531 DENV-4/ My01-22713	A549	Wang <i>et al.</i> (2009)
P02		Ligação a dobra β OG da proteína envelope	Triagem de larga escala computacional de 142.000 moléculas, com alvo a dobra β OG da proteína E. Ensaio de crescimento de vírus com o YFV-IRES-Luc.	13/371 μ M (Ensaio de XTT)	YFV	BHK21	Zhou <i>et al.</i> (2009)
A5		Inibe a fusão mediada pela proteína E	Triagem de ancoragem <i>in silico</i> de 135.000 moléculas, tendo como alvo a proteína E Ensaio de redução de placa.	1,2/ >100 μ M (Ensaio de MTT)	DENV-2/ NGC	Vero	Kampmann <i>et al.</i> (2009)

Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Conformatório	Atividade Celular CI ₅₀ /CC ₅₀ (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
1662G07		Ligação a proteína E dimérica, pré-fusão, na superfície do vírion, antes da adsorção a célula	Triagem de larga escala de 30.000 moléculas que bloqueiam ligação a peptídeo (Ensaio de polarização da fluorescência) Ensaio de formação de placa.	16,9/ >100 µM (AlamarBlue)	DENV-2/ NGC DENV-4/ TVP360 DENV-1/ WP74 DENV-3/ THD 3	BHK-21	Schmidt <i>et al.</i> (2012)
Peptídeo DN59	MAILGDTAWDFGSLGGV FTSIGKALHQVFGAIY	Ligação ao trímero de proteína E para impedir a ligação	Algoritmo físico- químico em combinação com dados estruturais da proteína E Ensaio de formação de placa	10/ >30 µM (Ensaio de MTT)	DENV-2/ NGC	LLCKM-2	Hrobowski <i>et al.</i> (2005)
Peptídeo 1OAN1	FWFTLIKTQAKQPARYRR FC	Interação com a proteína E para bloquear a adsorção do vírus	Desenho computacional de peptídeos, usando dados estruturais da proteína E Ensaio de redução de foco	7/ >50 µM (Ensaio de MTT)	DENV-2/ NGC	LLC-MK2	Costin <i>et al.</i> (2010)
Antibiótico SA-17		Entrada, possivelmente ligação a dobra βOG da proteína envelope	Inibição do efeito citopático Ensaio de redução de placa, quantificação do RNA viral	0,52/ 43 µM (Ensaio de MTS/ PMS)	DENV-1/ Djibouti DENV-1/ H/IMTSSA/98/606 DEN-2/ NGC DENV-3/ H87 DENV-4/ Dak HD 34 460	Vero-B	Kaptein <i>et al.</i> (2010)

Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Confirmatório	Atividade Celular CI_{50}/CC_{50} (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
Antibiótico LCTA-949		Entrada. Previne a adsorção do vírus à célula.	Ensaio de redução de efeito citopático	6,9/ >25 μ M (Ensaio de MTS/ PMS)	DENV-2/ NGC DENV-2/ 16681	Vero-B	De Burghgraeve <i>et al.</i> (2012)
ST-148		Inibidor da proteína de capsídeo (C)	Ensaio de redução de efeito citopático de cerca de 200.000 compostos Ensaio de redução de título viral	0,016/ >100 μ M (Resazurin e Ensaio <i>CellTiter Glo</i>)	DENV-1/ TH-Sman DENV-2/ NGC DENV-2/ K0049 DENV-2/ S221 DENV-3/ H87 DENV-4/ H241	Vero	Byrd <i>et al.</i> (2013a)
Derivados da tetraciclina, rolitetraciclina e doxiciclina		Bloqueia o rearranjo dos domínios II e I da proteína E durante a fusão de membranas	Triagem virtual baseada na observação do rearranjo conformacional na proteína E Ensaio de formação de placa	67,1/ (X) μ M 55,6/ (X) μ M (X)	DENV-2/ PL046	BHK- 21	Yang, <i>et al.</i> (2007)
Peptídeo DET4	AGVKDGLDF	Interfere com a adsorção e entrada do vírus	Ensaio de formação de placa	35/ >500 μ M (Ensaio de MTS)	DENV-2/ NGC	LLC-MK2	Alhoot <i>et al.</i> , (2013)

Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Confirmatório	Atividade Celular CI_{50}/CC_{50} (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
NN-DNJ		(X)	Ensaio de formação de placa Imunofluorescência	0,91/ 317 μ M (Ensaio MTS)	DENV-2/ D2S10 DENV-2/ 16681	Macrófago humano	Miller <i>et al.</i> , (2012)
Lectinas: HHA, GNA, UDA	(X)	Liga-se a glicoproteínas do DENV e interrompe a interação com receptores	Citometria de fluxo qRT-PCR Microscopia confocal	29 nM a 7 μ M (X)	DENV-2/ NGC DENV-1/ Djibouti DENV-3/ H87 DENV-4/ DakHD 34460	Raji/DC-SIGN mdDC	Alen <i>et al.</i> , (2011)
Fucoidan		Interação com a glicoproteína envelope do vírus	Ensaio de formação de foco	(X)	DENV-1/Lao/03 DENV-2/ ThNH-7/93 DENV-3/ BDH02-01 DENV-4/ ThD4-17/97	BHK-21	Hidari <i>et al.</i> (2008)
PI-88		Entrada	Citometria de fluxo	~200 μ g/ml (X)	DENV-2/ NGC	BHK-21	Lee <i>et al.</i> (2006)

Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Confirmatório	Atividade Celular CI ₅₀ /CC ₅₀ (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
NITD-618		NS4B	Ensaio de replicon de DENV-2 com luciferase em larga escala, triagem de 1,8 milhões de substâncias Imunodeteção baseada em célula (in situ ELISA)	1,0/ >40 µM (Ensaio CCK-8)	DENV-1/ West Pacific DENV-2/ NGC DENV-2/ TSV01 DENV-3/ H87 DENV-4/ H241	A549	Xie <i>et al.</i> (2011)
ARDP0006		NS2B-NS3	Triagem virtual para inibidores da protease NS2B-NS3 <i>In situ</i> ELISA	4,2/ 69 µM (Ensaio de MTT)	DENV-2/ NGC	LLC-MK2	Tomlinson <i>et al.</i> , 2009
SDM25N		Diminui a replicação de RNA interferindo direta ou indiretamente com a proteína NS4B	Ensaio de replicon de DENV-2	1,9/ >25 µM (Ensaio de MTS/ PMS)	DENV-2/ NGC	Hela	Cleef <i>et al.</i> (2013)
Composto 23i		Inibição da protease NS2B-NS3	Ensaio de replicon com reporter luciferase	24,7/ >100 µM (x)	(x)	(x)	Deng <i>et al.</i> (2012)
BP2109		Inibição da protease NS2B-NS3	Ensaio de alto rendimento utilizando um complexo de protease recombinante Ensaio de formação de placa	0,17/ 29,28 µM (Ensaio MTS)	DENV-2/ PL046	BHK21	Yang <i>et al.</i> (2011)

Substância	Estrutura	Modo de Ação	Tipos de Ensaios de Triagem e Confirmatório	Atividade Celular CI_{50}/CC_{50} (Ensaio de Citotoxicidade)	Sorotipo/ Cepa	Tipo Celular*	Referência
Ivermectina		Atividade anti-helicase	Ensaio de redução de efeito citopático qRT-PCR	0,7/ 3,8 μ M (Ensaio de MTS/ PMS)	DENV2/ NGC	Vero	Mastrangelo <i>et al.</i> (2012)
ST-610		Atividade anti-helicase	Ensaio de alta escala baseado em efeito citopático Ensaio de redução de título viral	0,272/ >100 μ M (Ensaio de resazurin)	DENV-1/ TH-Sman DENV-2/ NGC DENV-2/ K0049 DENV-3/ H87 DENV-4/ H241	Vero	Byrd <i>et al.</i> (2013b)

*BHK21: linhagem celular de rim de hamster recém-nascido; A549: linhagem celular epitelial de pulmão humano; Vero: linhagem celular de rim de macaco verde africano; LLCKM-2: linhagem celular epitelial de rim de macaco; mdDC: célula dendrítica derivada de monócito; Hela: linhagem celular epitelial humana. (x) indica dados não mostrados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito de extratos de macroalgas marinhas e de um painel de substâncias sintéticas na inibição da infecção por DENV *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a citotoxicidade de um painel de extratos de macroalgas marinhas e de substâncias químicas sintéticas, em linhagem celular Huh7.5;
- Padronizar e validar um ensaio para a triagem antiviral de substâncias candidatas a novos agentes anti-DENV;
- Fazer a triagem para ação anti-DENV de um painel de substâncias naturais extraídas de macroalgas marinhas e de substâncias químicas sintéticas, em linhagem celular Huh7.5;
- Estabelecer os valores de CC_{50} , IC_{50} e IS para a escolha das substâncias mais promissoras (*hits*);
- Identificar possíveis modos de ação das substâncias escolhidas;
- Avaliar a citotoxicidade e atividade antiviral das substâncias escolhidas em células mononucleares de sangue periférico de doadores humanos saudáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS DE CÉLULAS E VÍRUS

A linhagem celular de hepatoma humano Huh7.5 (ATCC PTA-8561) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco/ mistura nutriente F-12 (D-MEM/F-12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 UI/ μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen, EUA) em ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. A linhagem de células C6/36 de *Aedes albopictus* (ATCC CRL-1660) foi cultivada em meio Leibovitz L-15 suplementado com 5% SFB, 25 μ g/mL de gentamicina (Gibco/Invitrogen, EUA) e 0,26% de triptose (Sigma-Aldrich, EUA) a 28°C.

O vírus DENV-1/FGA/89 foi isolado de um paciente com febre de dengue na América do Sul em 1989 e gentilmente cedido pelo Dr. Philippe Desprès (*Unité des Interactions Moléculaires Flaviviruses-Hôtes* do Instituto Pasteur, Paris, França). DENV-1/BR/90, DENV-2/BR/01-01, DENV-2/265 e DENV-3/97 são isolados clínicos de pacientes com febre de dengue, obtidos no Brasil entre os anos de 1990 e 2004. DENV-3/5532 foi isolado de um caso fatal de dengue com complicação visceral em Lambaré, Paraguai em 2007. DENV-4/TVP360 é uma cepa de laboratório cedida pelo Dr. Ricardo Galler da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os estoques de vírus foram obtidos por infecção em células C6/36 e após 5 a 7 dias o sobrenadante foi recolhido, centrifugado, aliquotado e titulado pelo ensaio de imunodeteção de foco.

3.2 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO DE FOCO

Os títulos virais foram determinados em unidades formadoras de foco por mL (UFF_{C6/36}/mL), pelo ensaio de imunodeteção de foco em células C6/36 como descrito anteriormente (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). Resumidamente, os sobrenadantes das culturas foram diluídos de forma seriada (1:10 em meio sem SFB) e adicionados em duplicata a placas de 24 poços (TPP, Suíça) com 1×10^5

células por poço. Após 1h30min, o inóculo foi substituído por uma cobertura de 1,6% de carboximetilcelulose (CMC) e meio L-15 suplementado com 5% SFB, 0,26% triptose e 25 µg/mL gentamicina. A imunodeteção dos focos foi feita após sete dias usando o anticorpo monoclonal de camundongo anti- proteína envelope (E) do gênero *Flavivirus* (hibridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112, identificado a partir de agora como 4G2), seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Promega, EUA). A revelação seguiu adicionando-se o substrato NBT (cloreto de tetrazólio nitro-azul) e BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato p-toluidina) (Promega, EUA) em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM). O título viral foi calculado de acordo com a equação: (Título = média dos focos contados x diluição do poço/ volume do inóculo) e o valor expresso como UFF_{C6/36}/mL.

3.3 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO EM CÉLULA (*in situ* ELISA)

Diversos parâmetros como a densidade ótima de células Huh7.5 por poço (variando de 1.6×10^5 a 5×10^3); a multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*-MOI) variando de 4 a 0,01 para cada sorotipo de vírus; protocolos para fixação das células (metanol:acetona ou paraformaldeído seguido de permeabilização com triton X-100), tampões de bloqueio (5% de SFB ou 2% de leite desnatado) e tempo de incubação após a infecção (48h ou 72h) foram analisados.

As melhores condições foram determinadas e usadas para os testes subsequentes. Resumidamente, após fixar as células com metanol:acetona por 2h a -20°C, foi adicionado tampão de bloqueio (PBS 1x com 2% de leite desnatado e 0,05% de Tween-20) por 30min. Após o bloqueio o anticorpo primário 4G2 foi adicionado (diluição 1:100 em tampão de bloqueio) e as placas incubadas a 37°C por 1h. Após o tempo de incubação as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (PBS 1x com 0,01% de Tween-20) e o anticorpo secundário produzido em cabra anti-IgG de camundongo HRP 1:12.000 (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado. As placas foram então incubadas por 1h a 37°C, e mais quatro ciclos

de lavagem foram realizados. O substrato TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) (KPL, EUA) foi adicionado e as placas incubadas de 10 a 15min para o desenvolvimento de cor, a reação foi bloqueada com H₂SO₄ 2N. A absorbância foi detectada em comprimento de onda de 450 nm na leitora híbrida Synergy H1M (Biotek, EUA).

Para a validação inicial do ensaio, células Huh7.5 foram infectadas com todos os sorotipos de DENV em uma série de MOIs, e após 72h, os ensaios de *in situ* ELISA e de imunodeteção de foco da mesma cultura foram comparados pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Uma segunda validação, utilizando *in situ* ELISA, imunodeteção de foco e ELISA comercial de captura de antígeno NS1 (*Panbio Dengue Early ELISA - second generation*, AUS), foi realizada com a infecção de células Huh7.5 com DENV-4 (MOI de 0,1), seguido de tratamento com interferon- α 2A (IFN- α 2A) (Blausiegel, BRA) em uma curva de concentração resposta (CCR). Os resultados dos três ensaios foram comparados e o IFN- α 2A foi utilizado como composto referência sendo que a CI₅₀ (concentração que inibe 50% da infecção viral) foi determinada usando a CCR para todos os sorotipos de DENV.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Inicialmente, foi realizada uma validação para o uso simultâneo dos ensaios de viabilidade celular de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MOSMANN, 1983) e Vermelho Neutro (VN) (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008) como indicado pelo trabalho de Chiba; Kawakami e Tohyama, (1998). Para isso, foi realizada uma curva de concentração resposta com o dimetil sulfoxido (DMSO) em células Huh7.5 e comparação da revelação com os testes isolados ou combinados. Também foi realizada uma curva com diferentes densidades celulares para determinar qual o número ótimo de células por poço.

Optou-se pela determinação da citotoxicidade dos extratos de algas e substâncias químicas sintéticas simultaneamente pelos ensaios de MTT e VN. Em síntese, células Huh7.5 foram semeadas em placas de 96 poços de fundo reto em uma densidade de 2×10^4 células/poço. Após 16h de incubação, as células foram tratadas com as substâncias em diluição seriada 1:2 em triplicata e incubadas a

37°C e 5% de CO₂. Controles positivo (apenas células sem tratamento) e negativo (apenas meio) para viabilidade celular foram incluídos em cada placa teste.

A revelação dos ensaios foi feita após 72h de incubação, removendo o sobrenadante e adicionando 33 µg/mL do reagente VN a cada poço, a placa foi então incubada por 1h a 37°C, 5% CO₂. Após este período, 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado e a placa incubada por mais 2h a 37°C e 5% de CO₂.

Após os tempos de incubação, o meio foi descartado e 150 µL de solução de extração de VN (ácido acético 1% e etanol 30%) foi adicionado a cada poço e incubado por 15min sob agitação. A solução foi então transferida para outra microplaca, e a absorbância determinada em leitor de placa híbrido a 540 nm. Os cristais de formazana foram extraídos pela adição de 150 µL de DMSO. A densidade ótica foi medida em leitura diferencial a 550 nm e 630 nm com o leitor de placa híbrido (Synergy H1M, Biotek, USA).

Os dados foram normalizados de acordo com a equação: % de viabilidade celular = (valor do experimento - controle negativo)/ (controle positivo - controle negativo) x 100. A curva de concentração resposta foi obtida usando a regressão não linear (curva de ajuste), e a concentração citotóxica 50 (CC₅₀) foi calculada como a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%.

3.5 COLETA E EXTRAÇÃO QUÍMICA DE ALGAS MARINHAS

Quinze espécies de algas marinhas foram coletadas na zona interdital da costa do estado de Pernambuco, Brasil, de Agosto a Outubro de 2009. O material foi limpo manualmente de epífitas imediatamente após a coleta e seco ao ar. As amostras foram identificadas e espécimes testemunho foram depositadas no Herbário Botânico do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

O material de algas secas (10 g por amostra) foi exaustivamente extraído a temperatura ambiente com diclorometano/metanol (2:1), produzindo 15 extratos brutos que foram evaporados até secarem em baixa temperatura (<50°C) em um evaporador rotatório (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estes foram então recuperados em DMSO 100% para atingir a concentração de 25 mg/mL e armazenados em alíquotas

protegidas da luz a -20°C. Todo o procedimento de coleta e obtenção dos extratos brutos de alga foi realizado pelo Dr. Éverson Bianco na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), que gentilmente nos cedeu estas amostras para estudos de triagem antiviral contra o DENV.

3.6 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS SINTÉTICAS

Um total de 49 substâncias químicas sintéticas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mauro Vieira de Almeida da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) para triagem antiviral contra o vírus da dengue.

Em especial, uma série de substâncias da classe das antraquinonas obtidas a partir da 1,4-dihidroxiantraquinona (Figura 9). Suas estruturas são análogas a substância ARDP0006 que apresentou atividade antiviral contra DENV (TOMLINSON; WATOWICH, 2011; TOMLINSON *et al.*, 2009).

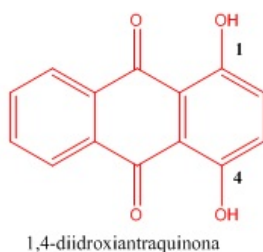


Figura 9 – Estrutura química da substância 1,4-dihidroxiantraquinona, base para a síntese de outras substâncias utilizadas na triagem antiviral.

3.7 TRIAGEM ANTIVIRAL CONTRA O DENV

As substâncias ou extratos foram triados em triplicata com uma concentração não tóxica em DMSO 1%, que foi determinada pelos ensaios de MTT e VN. O controle negativo (meio com 1% DMSO) e o controle positivo (IFN- α 2A 100 UI/mL) para atividade antiviral foram incluídos em todas as placas teste. As células

Huh7.5 foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 por poço em placas de 96 poços de fundo reto, 16h antes da infecção. O meio de cultivo foi removido e 100 μ L do inóculo viral (MOI de 4 para DENV-1, -2 e -3; e MOI de 0,1 para DENV-4) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por 1h30min a 37°C, 5% CO₂. O inóculo foi substituído por 200 μ L de meio ou cada diluição das substâncias ou extratos. Após um período de incubação de 72h, as células foram fixadas e o *in situ* ELISA realizado como descrito anteriormente. Os dados foram normalizados como % de infecção em relação aos controles, onde a DO obtida com o controle não infectado (Mock) foi considerado como 0% de infecção, e a obtida com o controle não tratado como 100% de infecção.

3.8 ENSAIO DE TEMPO DE ADIÇÃO

Células Huh7.5 em uma densidade de 2×10^4 células/poço foram infectadas com DENV-4 (MOI de 0,1). A quantidade de antígeno viral intracelular foi determinada pelo ensaio de *in situ* ELISA, e a progênie viral no sobrenadante pelo ensaio de imunodeteção de foco. Neste experimento, três diferentes tempos de tratamento foram testados. A concentração não tóxica (CNT) dos extratos de algas A1, A3, A8 e A12 foram adicionados 1h30min antes da infecção (i), durante e após a infecção- tempo 0 (ii) e 1h30min após a infecção (iii).

3.9 CURVA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA

A curva de concentração resposta foi obtida utilizando o tratamento (ii), durante e após a infecção, com uma diluição seriada (1:2) a partir da CNT de cada extrato ou substância para a obtenção do CI₅₀ e índice de seletividade (IS= CC₅₀/CI₅₀).

3.10 ENSAIO DE ADSORÇÃO E INTERNALIZAÇÃO

Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente (TALARICO *et al.*, 2005) com algumas modificações. Em resumo, o ensaio de adsorção viral foi feito com células Huh7.5 cultivadas em placas de 96 poços com a densidade de 2×10^4 células/poço e infectadas com DENV-4 com MOI de 0,1 na presença ou ausência dos extratos de algas A1, A3, A8 e A12 na CNT e incubado por 1h a 4°C. O inóculo viral foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS 1x gelado. Meio completo foi adicionado aos poços e as placas incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 72h. Após o período de incubação, o ensaio *in situ* ELISA foi revelado como descrito anteriormente.

Para o ensaio de internalização, células Huh7.5 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 2×10^4 células/poço e infectadas com DENV-4 (MOI de 0,1). Após incubação por 1h a 4°C, os vírus não adsorvidos foram removidos e as células lavadas com PBS 1x. Meio com ou sem os extratos de algas A1, A3, A8 e A12 na CNT foi adicionado e as placas incubadas a 37°C por 1h. Após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS 1x e tratadas com 0,1 mL de tampão citrato (40 mM de ácido cítrico, 10 mM de cloreto de potássio, 135 mM de cloreto de sódio, pH 3) por 1 min, para inativar os vírus adsorvidos mas não internalizados. As células foram lavadas com PBS 1x, e meio completo foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 72h e o ensaio de *in situ* ELISA foi revelado como descrito anteriormente. Para ambos os ensaios, o anticorpo neutralizante 4G2 foi utilizado como controle.

3.11 ENSAIO VIRUCIDA

O ensaio virucida foi feito conforme descrito por De Burghgraeve *et al.* (2012) com algumas modificações. O vírus DENV-4 (2×10^5 UFF_{C6/36}/ml) foi incubado na presença ou ausência dos extratos de alga A1, A3, A8 e A12 na CNT, e na presença ou ausência de 150 µg/mL de RNase A (USB, EUA) por 1h a 37°C. O RNA viral purificado da mesma cepa foi usado como controle positivo para a atividade virucida.

Após o período de incubação o RNA viral foi isolado utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, e as amostras foram submetidas a RT-PCR (LANCIOTTI *et al.*, 1992). O cDNA foi obtido utilizando o kit comercial Improm II Reverse Transcriptase (Promega, EUA) utilizando oligonucleotídeos degenerados (250 pmol) a 42°C por 1h.

A reação de PCR foi realizada usando *Taq* DNA polimerase e os oligonucleotídeos D1 (5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') e D2 (5'-ATTGCACCAGCAGTCAACGTCATCTGGTTC-3'), e 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1 min em termociclador (GeneAmp PRC System 9700, Applied Biosystems, EUA).

A presença de produtos específicos de amplificação do genoma viral foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com GelRed (Biotium, EUA).

3.12 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas de três doadores humanos saudáveis (80 mL) através de punção venosa realizada por um técnico treinado e mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz, número 514/09). O sangue coletado foi diluído na proporção de 1:2 em solução de NaCl 0,9%, esta mistura foi então adicionada a uma solução separadora de linfócitos (*Lymphocyte Separation Medium*, Lonza, EUA) na proporção de 1:4 e centrifugada a 750 g por 20 minutos em temperatura ambiente sem uso de aceleração e freio.

Após a centrifugação, a interfase contendo PBMCs foi retirada e submetida a lise de hemácias com solução de cloreto de amônio 0,16 M por 5 min no gelo. Após a lise de hemácias, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS suplementado com 0,5% BSA, EDTA 0,058%; ressuspensas em meio RPMI-1640 (Lonza, EUA) acrescido de 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina (Gibco-Life Technologies, Brasil), 100 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA), 100 µg/U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen, EUA) e 2,5 µg/mL de

anfotericina (Sigma-Aldrich, EUA), e a concentração celular foi determinada em câmara de Neubauer.

Em seguida, 1×10^6 células por amostra de cada doador (em placa de 24 poços) foram submetidas a infecção com DENV-4 (MOI de 10) por 2h a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ e tratamento durante e após a infecção com as substâncias de escolha na CNT. No quinto dia após a infecção, o sobrenadante das culturas foi recuperado e armazenado a -80°C. As células foram submetidas a marcação para infecção por DENV e ensaio de apoptose.

Para a determinação da taxa de infecção, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços em tampão de bloqueio (PBS, 5% de SFB e 2% de soro humano) por 20 min. As células foram então fixadas e permeabilizadas com *Cytofix/Cytoperm* (Becton & Dickinson, EUA) por 20 min e submetidas a marcação com anticorpo 4G2 (1:100 em tampão *Permwash*) e o anticorpo secundário anti- IgG de camundongo Alexa 488 (1:300 em *Permwash*) (Invitrogen, Brasil), sendo cada incubação de 20 min a 37°C e lavagem com *Permwash*. Por fim, as células foram recuperadas em PBS filtrado e os dados adquiridos pelo equipamento BD FACS Canto II (Plataforma de Citometria de Fluxo- RPT08L PDTIS/Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná) com análise através do programa Flowjo versão XV (Tree Star, EUA).

Para o ensaio de morte celular, as células foram marcadas utilizando o kit *Annexin V:PE-Cy7 Apoptosis Detection Kit* (Becton & Dickinson, EUA) e 7ADD:APC, conforme as instruções do fabricante. Como descrito anteriormente, as amostras foram analisadas no equipamento BD FACS Canto II e o programa Flowjo versão XV. As células com marcação dupla negativa foram consideradas como células viáveis e o controle não tratado foi considerado como 100% de viabilidade, para comparação com as amostras tratadas.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após normalização, os dados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA seguido pelos testes de Tukey ou Dunnett. O teste de correlação de Pearson foi usado para comparar os resultados de ensaios diferentes. A curva de

concentração resposta sigmoidal (inclinação variável) foi utilizada para a obtenção de valores de CC_{50} e CI_{50} . As análises foram realizadas usando o software Prism (GraphPad versão 5.0c, EUA), com nível de significância de $p < 0,05$. O desempenho do ensaio de *in situ* ELISA foi determinado pela relação do sinal positivo e valor de fundo (*signal to background*) $S/B = (M_{max}/M_{min})$, e do fator $Z = 1 - [3 \times (SD_{max} + SD_{min}) / (M_{max} - M_{min})]$ onde M_{max} e M_{min} representam os valores de densidade óptica média dos controles positivo e negativo, e SD_{max} e SD_{min} são os respectivos desvios padrão dos mesmos (ZHANG, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA TRIAGEM ANTIVIRAL

Existem diversos meios para a realização de triagem antiviral de substâncias sintéticas e produtos naturais, desde ensaios que permitem que poucas substâncias sejam testadas simultaneamente e que podem levar até 7 dias para se obter os resultados, como o convencional ensaio de redução de placa ou titulação viral (BYRD *et al.*, 2013a; KAMPMANN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009); e ensaios de alta performance realizados em placas de 384 até 1536 poços, que podem facilmente triar milhares de substâncias em poucos dias (CRUZ *et al.*, 2013; SHUM *et al.*, 2010).

Para a escolha do teste de triagem antiviral para o DENV, foi levado em consideração o conhecimento adquirido durante um estágio realizado no Centro para o Descobrimento de Drogas para Doenças Negligenciadas (CND3), na época sob a direção do Dr. Lucio Freitas Junior, no Instituto Pasteur da Coréia do Sul (IPK), em Seul. O IPK tem como missão transformar pesquisa básica em produtos farmacêuticos para uso em saúde humana. Nesse caso, foi desenvolvido um ensaio de alto rendimento baseado em imagem usando uma visão computacional inovadora para triar uma biblioteca de 4.000 substâncias sintéticas ligadoras de quinases quanto sua atividade anti-dengue. Usando esse ensaio foi possível identificar um grupo de substâncias que apresentaram uma ampla atividade antiviral contra os quatro sorotipos do DENV (Apêndice I).

Uma vez que o Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR) não dispunha de equipamentos para triagem em larga escala, o ensaio de escolha deveria ser capaz de: 1) processar um número médio de substâncias simultaneamente, 2) ter custo moderado e 3) não utilizar equipamentos de alto custo, difícil acesso e manipulação. Baseado nessas premissas, um ensaio de ELISA tendo células infectadas como substrato (*in situ* ELISA) em placa de 96 poços foi padronizado e validado para este fim.

Para obter os melhores resultados possíveis, diversos aspectos do ensaio foram otimizados. Inicialmente a densidade celular por poço foi avaliada, e seis diferentes concentrações da linhagem celular Huh7.5 variando de 5×10^3 a $1,6 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas. Após 16h, as células foram infectadas com a cepa DENV-1/FGA/89 com multiplicidade de infecção (MOI) de 4 por 1h30min, então o inóculo foi removido e meio completo foi adicionado às placas, que foram incubadas por mais 72h. As concentrações intermediárias testadas apresentaram os maiores valores de absorbância (Figura 10A) e a densidade celular de 2×10^4 mostrou a melhor relação do sinal positivo e valor de ruído de fundo $S/B = 5,8$ (*signal to background*), tendo sido escolhida para os demais testes. As culturas de células em concentração maior que $1,6 \times 10^5$ por poço tendem a crescer demais e desprender dos poços durante as lavagens, resultando em menores valores de absorbância e maiores valores de ruído de fundo.

Em seguida, reagentes de fixação e bloqueio foram avaliados. O procedimento usando os solventes orgânicos metanol e acetona mostraram resultados superiores quando comparado com a fixação de células com paraformaldeído seguido de permeabilização com Triton X-100 (Figura 10B). Outra vantagem do primeiro procedimento de fixação é que ele precipita proteínas e dissolve lipídios das membranas celulares assegurando a permeabilidade a anticorpos em uma mesma etapa (JAMUR; OLIVER, 2010). Adicionalmente o bloqueio de reações inespecíficas usando 2% de leite desnatado ou 5% de SFB mostraram resultados similares, e o leite desnatado foi escolhido por sua maior disponibilidade e preço mais acessível.

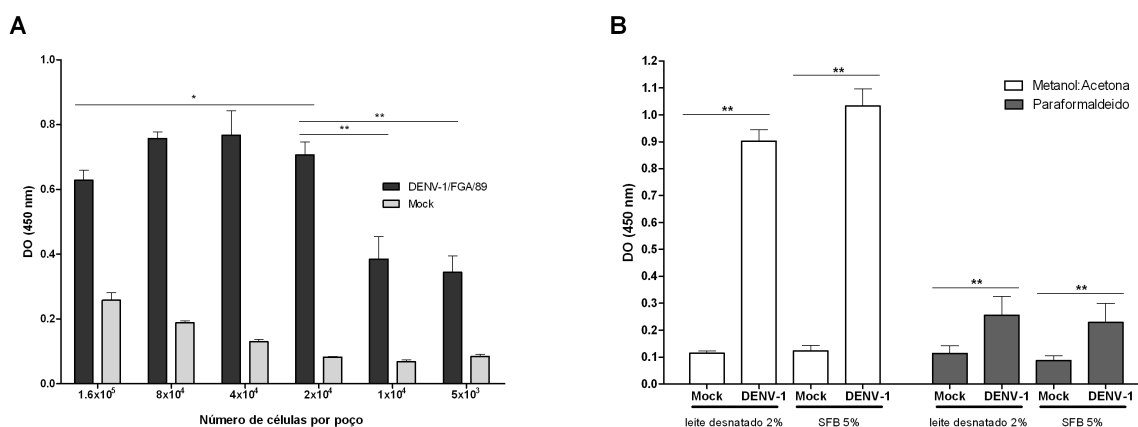


Figura 10 – Padronização do ensaio de *in situ* ELISA. Diferentes densidades de células por poço foram plaqueadas e infectadas com DENV-1/FGA/89 ou com apenas meio de cultura (Mock), após 72h foram fixadas e reveladas por *in situ* ELISA (A). Duas soluções fixadoras (metanol:acetona ou paraformaldeído) e de bloqueio (leite desnatado 2% ou soro fetal bovino 5%) foram avaliados (B). Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

As etapas finais para a padronização do teste *in situ* ELISA foram definir o MOI para cada sorotipo do DENV e o tempo de incubação após a infecção. Para todos os sorotipos de DENV, com exceção do DENV-4/TVP360, a maior absorbância foi observada com MOI de 4 e 72h após a infecção. O DENV-4/TVP360 apresentou valores altos de densidade ótica (DO) nos dois tempos e até para os menores MOIs testados. Assim o MOI de 0,1 em 72h após a infecção foi escolhido para esta cepa (Figura 11). Esta característica pode estar relacionada ao fato desta ser uma cepa de laboratório já adaptada a cultura de células.

Em relação ao tempo de incubação após a infecção, um maior período de incubação (72h) apresentou maiores valores de DO, provavelmente porque permite que mais ciclos de replicação viral ocorram (Figura 11). Assim concluiu-se a etapa de padronização do ensaio de *in situ* ELISA, garantindo as melhores condições de cultivo celular de Huh7.5 em placas de 96 poços, e a quantificação da infecção pelos quatro sorotipos do DENV.

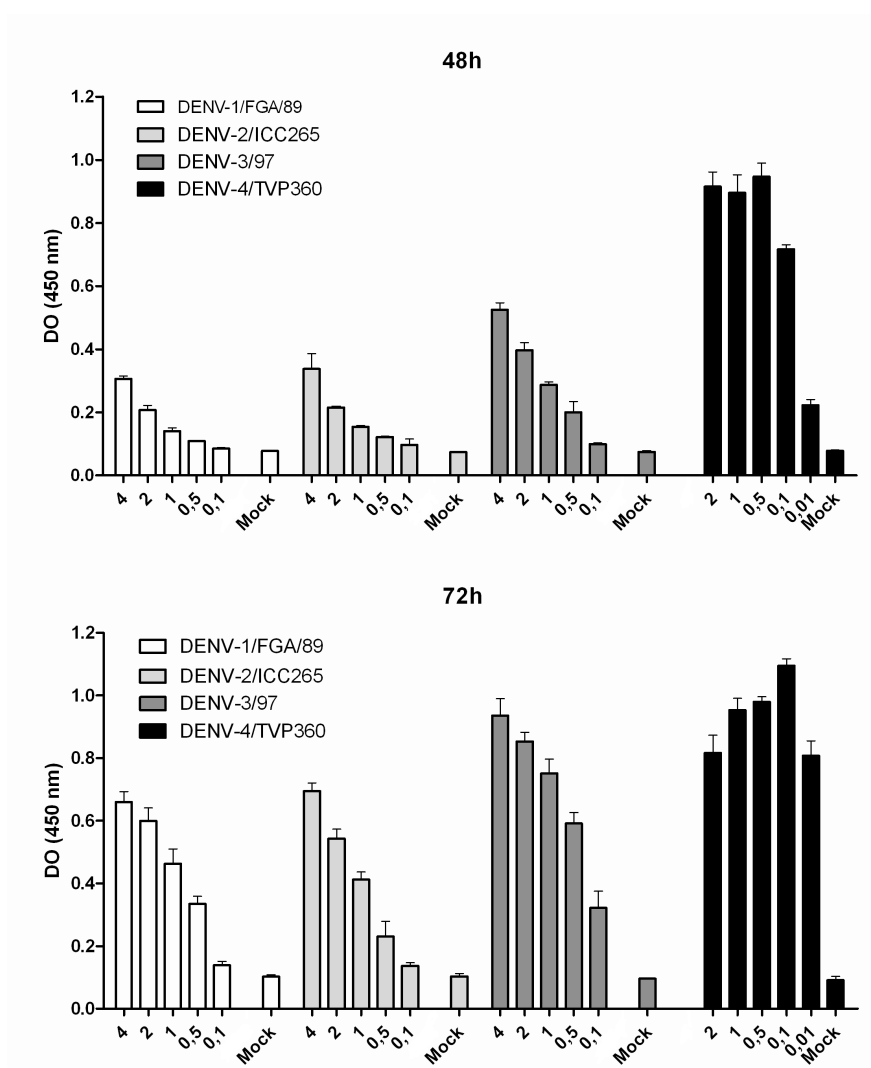


Figura 11 – Padronização do ensaio de *in situ* ELISA. Diferentes MOIs para cada sorotipo de DENV foram testados em células Huh7.5 com tempos de incubação de 48h e 72h. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

Seguindo com as etapas de validação do ensaio de *in situ* ELISA proposto, este foi comparado com o ensaio de formação de foco, comumente usado para quantificar a infecção viral em testes de triagem (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993; ZHANG *et al.*, 2009). Ambos os ensaios foram realizados em paralelo usando células e sobrenadante da mesma cultura. A comparação entre a DO e o título viral para DENV-1, -2 e -3 resultou em uma curva linear e com alta correlação (média de $r^2 = 0,95$) (Figura 12). Entretanto, em relação ao DENV-4, esse resultado não foi observado, devido aos altos valores de DO e título viral para todos os MOIs testados. Este resultado foi observado anteriormente e pode refletir a adaptação desta cepa em cultivo celular.

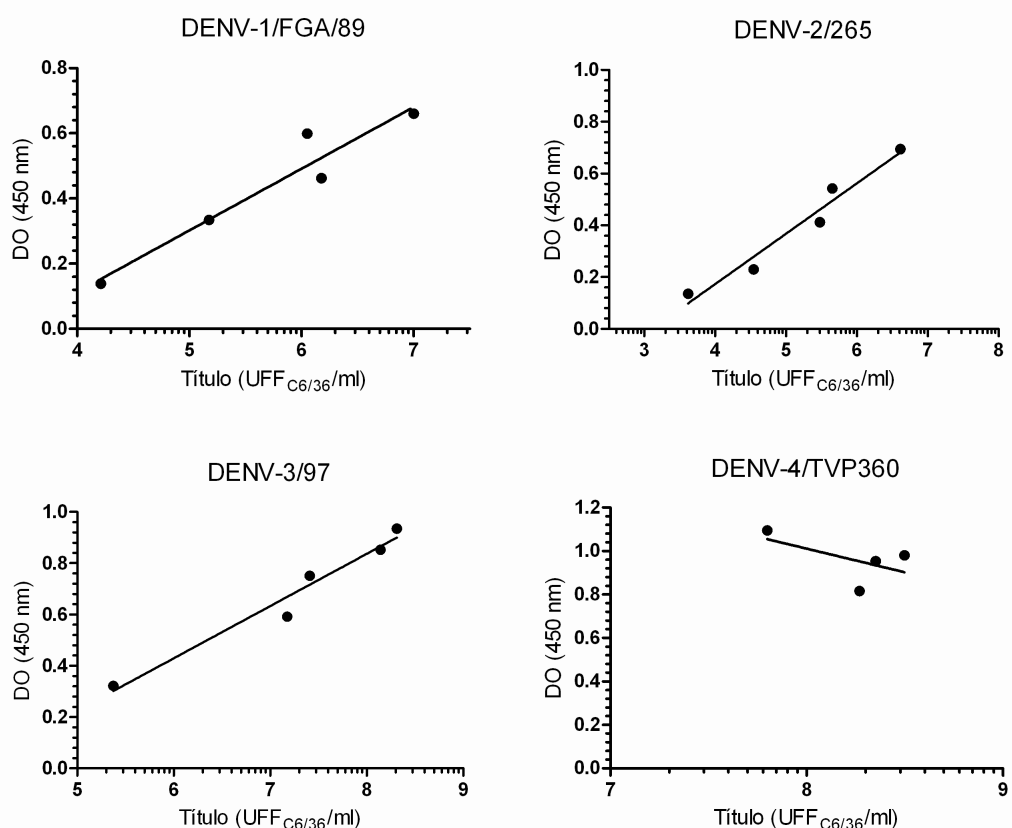


Figura 12 – Validação do ensaio de *in situ* ELISA. Células Huh7.5 foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células por poço, e inoculadas com diferentes MOIs de cada DENV. Após 72h as células foram utilizadas para o ensaio de *in situ* ELISA e o sobrenadante para o ensaio de imunodeteção de foco, e foram comparadas pela correlação de Pearson. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

Para analisar a atividade antiviral de substâncias por qualquer ensaio de triagem é indicado dispor de um controle referência de tratamento. Para tanto, foi escolhido o IFN- α 2A que é uma molécula com atividade antiviral utilizada no tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C (CLERCQ, 2009) e mostrou-se um eficaz inibidor *in vitro* da replicação de diversos *Flavivirus* patogênicos, incluindo dengue (CRANCE *et al.*, 2003). Como esperado, o IFN- α 2A não foi tóxico e apresentou atividade antiviral contra o DENV de forma dose dependente como mostrado pelas curvas de concentração resposta para os quatro sorotipos, e apresentou uma CI_{50} média de 2,94; 2,32; 2,64 e 5,79 UI/mL para os sorotipos 1, 2, 3 e 4 respectivamente (Figura 13). A concentração de 100 UI/mL foi utilizada como controle referência para os demais experimentos.

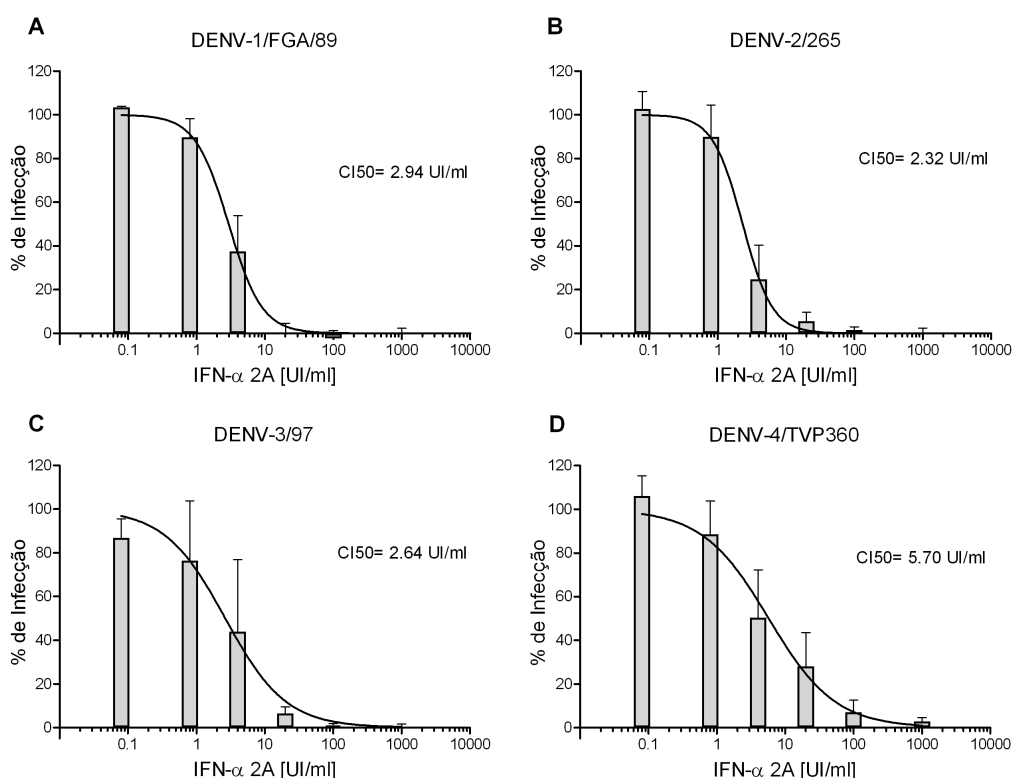


Figura 13 – Curva dose-resposta para o composto controle IFN- α 2A com MOI de 4 para os sorotipos 1, 2 e 3; e MOI de 0,1 para o sorotipo 4, após 1h30min o inóculo foi removido e a cultura tratada com IFN- α 2A em concentrações variando de 1000 a 0,08 UI/mL. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

Adicionalmente, foi realizado um ensaio comparativo utilizando a curva de concentração resposta para IFN- α 2A em células Huh7.5 infectadas com o DENV-4, e quantificação da infecção pelos ensaios de formação de foco, *in situ* ELISA e um ELISA de captura de NS1 comercial (Figura 14). Os resultados asseguram que o ensaio de *in situ* ELISA é confiável para a triagem de atividade antiviral contra o DENV, tendo apresentado resultados comparáveis a técnica clássica de formação de foco e ao teste comercial de quantificação de NS1 viral.

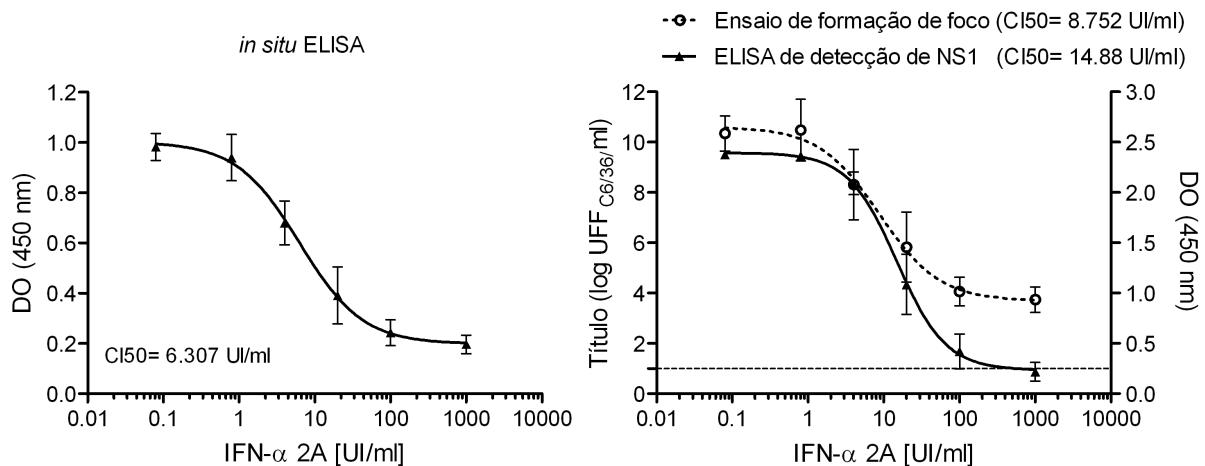


Figura 14 – Validação do ensaio de *in situ* ELISA. Comparação da curva de dose resposta e o CI₅₀ para o IFN- α 2A e infecção por DENV-4, obtidos com o *in situ* ELISA, o ensaio de imunodeteção de foco e um ensaio de ELISA de captura comercial para detecção do antígeno NS1. Média \pm DP de três experimentos independentes, analisados por curva de concentração-resposta sigmoidal (declive variável). A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio de imunodeteção de foco.

Assim que as etapas de padronização e validação do ensaio de *in situ* ELISA para a triagem de substâncias antivirais foram cumpridas, iniciou-se a triagem dos extratos de macroalgas marinhas e substâncias químicas sintéticas. O fluxo de trabalho dos ensaios *in situ* ELISA está representado na Figura 15.

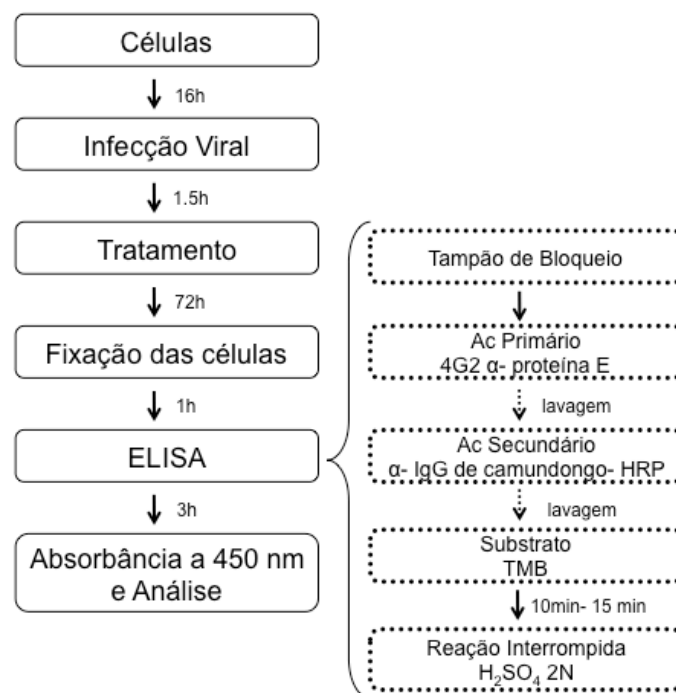


Figura 15 – Fluxograma do ensaio *in situ* ELISA.

Com a finalidade de racionalizar o curso da triagem antiviral e o potencial modo de ação das substâncias que apresentaram bons resultados em relação a inibição da infecção (*hits*), foi criado um fluxograma (Figura 16) para nortear os estudos, sendo que pequenas alterações poderiam ser feitas de acordo com os resultados obtidos em cada etapa realizada.

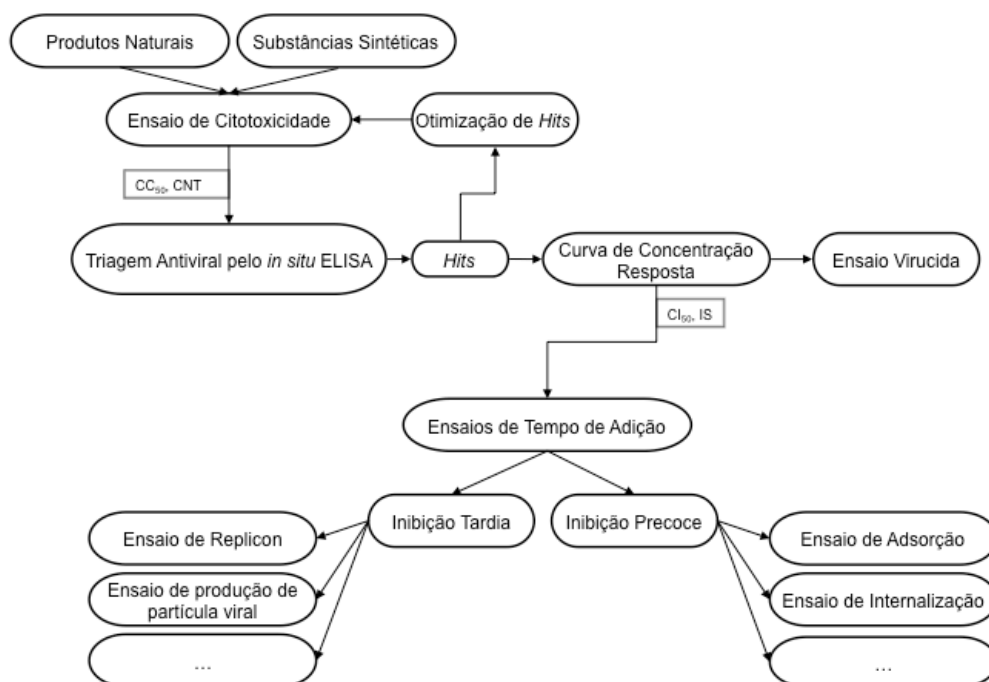


Figura 16 – Fluxograma para o processo de triagem antiviral e busca pelo modo de ação das substâncias mais promissoras (*hits*).

Uma desvantagem do ensaio de *in situ* ELISA para a triagem de agentes antivirais é que ele não produz informação sobre a possível citotoxicidade das substâncias. Dessa forma, é necessário realizar testes de viabilidade celular previamente à triagem antiviral. Vale ressaltar que para as triagens antivirais sempre foram utilizadas concentrações não citotóxicas determinadas pelas técnicas de MTT e VN.

4.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para a determinação da concentração não tóxica dos extratos de algas e substâncias químicas sintéticas, foram utilizados os ensaios de MTT e VN. Estes foram escolhidos por avaliarem a viabilidade celular de formas distintas: o MTT avalia a entrada e redução do sal de tetrazolium por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983), já o teste de VN avalia a capacidade da célula em manter o gradiente de pH em organelas como os lisossomos (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Usualmente estes ensaios são realizados separadamente, entretanto Chiba; Kawakami e Tohyama, (1998) propuseram a realização simultânea dos ensaios. Para comprovar que não haveria perda na performance dos testes ou mudança nos resultados, os ensaios de MTT e VN foram avaliados isoladamente e de forma combinada para determinar a viabilidade celular de células Huh7.5 tratadas com diferentes concentrações de DMSO (Figura 17), um solvente polar tóxico em altas concentrações. A comparação dos resultados mostra que não há diferença significativa entre as duas formas do ensaio, isolado ou combinado. Dessa forma, optou-se pelo teste combinado por poupar tempo e extrato/substância, já que utiliza a mesma cultura de células para ambos os ensaios. No mesmo experimento foi determinada a curva de concentração resposta para o DMSO, e escolheu-se a concentração final de 1% como diluente das amostras por não apresentar toxicidade para esta linhagem celular nas condições testadas (72h de tratamento).

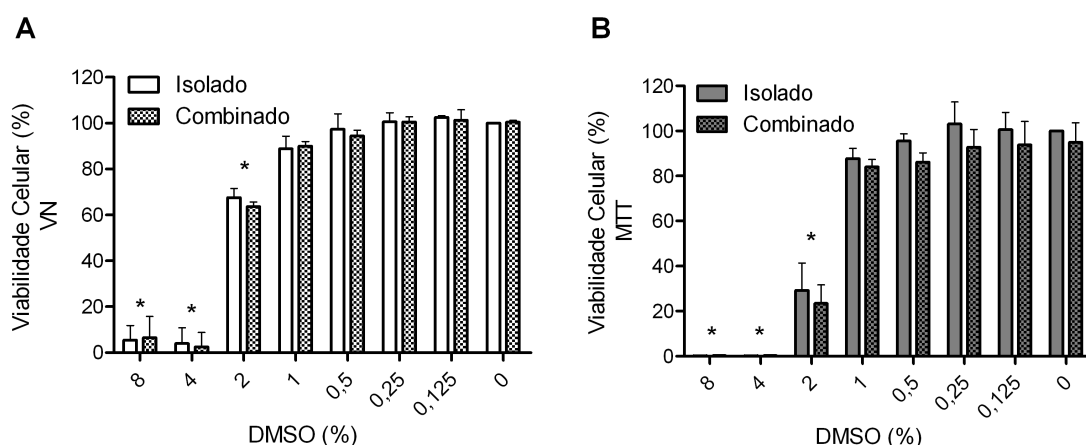


Figura 17 – Comparação entre os ensaios de VN (A) e MTT (B) realizados de forma isolada e combinada. Curva de dose resposta para o DMSO, incluindo a concentração de 1% utilizada como diluente para as substâncias nos testes. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado, não houve diferença significativa entre os ensaios isolado e combinado.

Em seguida diferentes densidades celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 72h os ensaios de MTT e VN foram realizados. O resultado mostra que com o aumento do número de células há um maior valor de DO até atingir um platô e começar a diminuir, provavelmente devido ao fato do poço estar com células sobrepostas facilitando com que elas se soltem da placa. Com isso, escolheu-se trabalhar com a quantidade inicial de 2×10^4 células por poço para os ensaios de viabilidade celular (Figura 18).

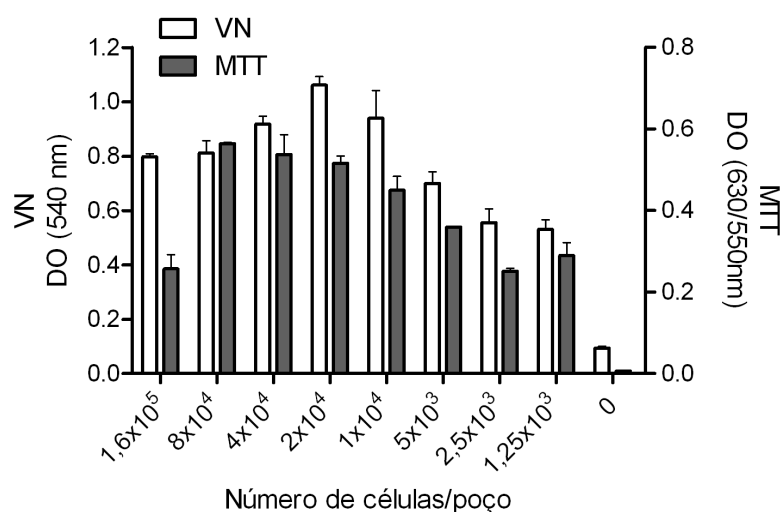


Figura 18 – Relação entre o valor de DO e o número de células inicial por poço. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.3 TRIAGEM ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE MACROALGAS MARINHAS

Um total de 15 algas marinhas pertencentes aos filos *Phaeophyta*, *Rhodophyta* e *Chlorophyta*, foram coletadas na zona intertidal da costa do estado de Pernambuco, Brasil. A partir destas, 15 extratos brutos foram obtidos e estão listados na tabela 4 de acordo com sua origem de coleta e espécie. Todos os extratos foram solubilizados em DMSO 100% para a concentração de 25 mg/mL, solução estoque.

Tabela 4 – Lista das macroalgas marinhas que deram origem aos extratos e seus locais de coleta.

Espécie de Macroalga Marinha	Local da coleta (Latitude/Longitude)	Extrato
Phylum Phaeophyta*		
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützinger) De Paula & De Clerck	Paraíso (08°21'S/ 34°57'W)	A1
<i>Dictyota mertensii</i> (Martius) Kützinger	Itapuama (08°17'S/ 34°57'W)	A15
<i>Dictyopteris delicatula</i> J.V. Lamour	Calhetas (08°20'S/ 34°56'W)	A2
<i>Padina gymnospora</i> (Kütz.) Sond.	Boa Viagem (08°07'S/ 34°53'W)	A3
<i>Lobophora variegata</i> (J.V. Lamour.) Womersley ex E.C. Oliveira	Calhetas (08°20'S/ 34°56'W)	A4
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i> E. de Paula & E. C. Oliveira	Paraíso (08°21'S/ 34°57'W)	A5
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>vulgari</i>	Paraíso (08°21'S/ 34°57'W)	A6
Phylum Rhodophyta*		
<i>Digenia simplex</i> (Wulfen) C. Agardh	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A9
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A7
<i>Palisada perforata</i> (Bory) K.W. Nam	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A8
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen in Jacquin) J. V. Lamour.	Paraíso (08°21'S/ 34°57'W)	A10
<i>Gracilaria</i> sp.	Viagem (08°07'S/ 34°53'W)	A11
Phylum Chlorophyta*		
<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory) Kütz.	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A13
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i> (Forssk.)	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A14
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh var. <i>racemosa</i>	Suape (08°22'S/ 34°56'W)	A12

* *Phaeophyta* = Algas pardas; *Rhodophyta* = Algas vermelhas; *Chlorophyta* = Algas verdes.

Os extratos de algas foram submetidos aos dois ensaios de viabilidade celular *in vitro* para determinar o nível de citotoxicidade dos mesmos. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, após 16h foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos em DMSO 1% e incubadas por 72h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após o período de incubação a viabilidade celular foi analisada pelo teste de redução do MTT e entrada de VN em células viáveis (Apêndice II). As concentrações não citotóxicas e o CC₅₀ (concentração que diminui a viabilidade celular em 50%) foram obtidos após análise estatística e são mostrados na tabela 5. As concentrações não citotóxicas variaram de 31,25 µg/mL a 250 µg/mL. O extrato A7 foi altamente tóxico em todas as concentrações testadas e por este motivo não foi utilizado no ensaio de triagem antiviral.

Tabela 5 – Concentração não citotóxica e CC₅₀ dos extratos de alga avaliados pelos ensaios de MTT e VN.

Extrato	CC ₅₀ (µg/ml)		Concentração não citotóxica (µg/ml)
	VN	MTT	
A1	127,00	86,56	31,25
A2	>250,00	>250,00	125,00
A3	>250,00	>250,00	125,00
A4	>250,00	148,50	62,50
A5	237,70	217,30	62,50
A6	224,10	233,20	62,50
A7	1,06	0,62	<0,50
A8	>250,00	239,50	125,00
A9	>250,00	85,26	62,50
A10	>250,00	101,60	31,25
A11	>250,00	>250,00	125,00
A12	178,60	121,80	62,50
A13	91,40	84,38	31,25
A14	79,13	66,05	31,25
A15	111,70	77,07	31,25

Após determinar as concentrações não citotóxicas dos extratos de macroalgas, estes foram triados quanto à possível atividade antiviral contra os

quatro sorotipos de DENV utilizando-se as cepas provenientes de isolados clínicos DENV-1/FGA/89, DENV-2/ICC265, DENV-3/97 e a cepa adaptada em laboratório DENV4-TVP360. A triagem foi feita em placas de 96 poços através do ensaio *in situ* ELISA. A variação poço a poço foi avaliada pela medição de parâmetros estatísticos padrões, sendo o S/B médio de 7,2 e o fator-Z de 0,62. Quatorze extratos de algas foram triados em concentrações não tóxicas e os extratos A1, A2, A3, A8, A9, A11, A12 e A14 apresentaram uma inibição da infecção por DENV para pelo menos um sorotipo, quando comparado ao controle não tratado (Figura 19).

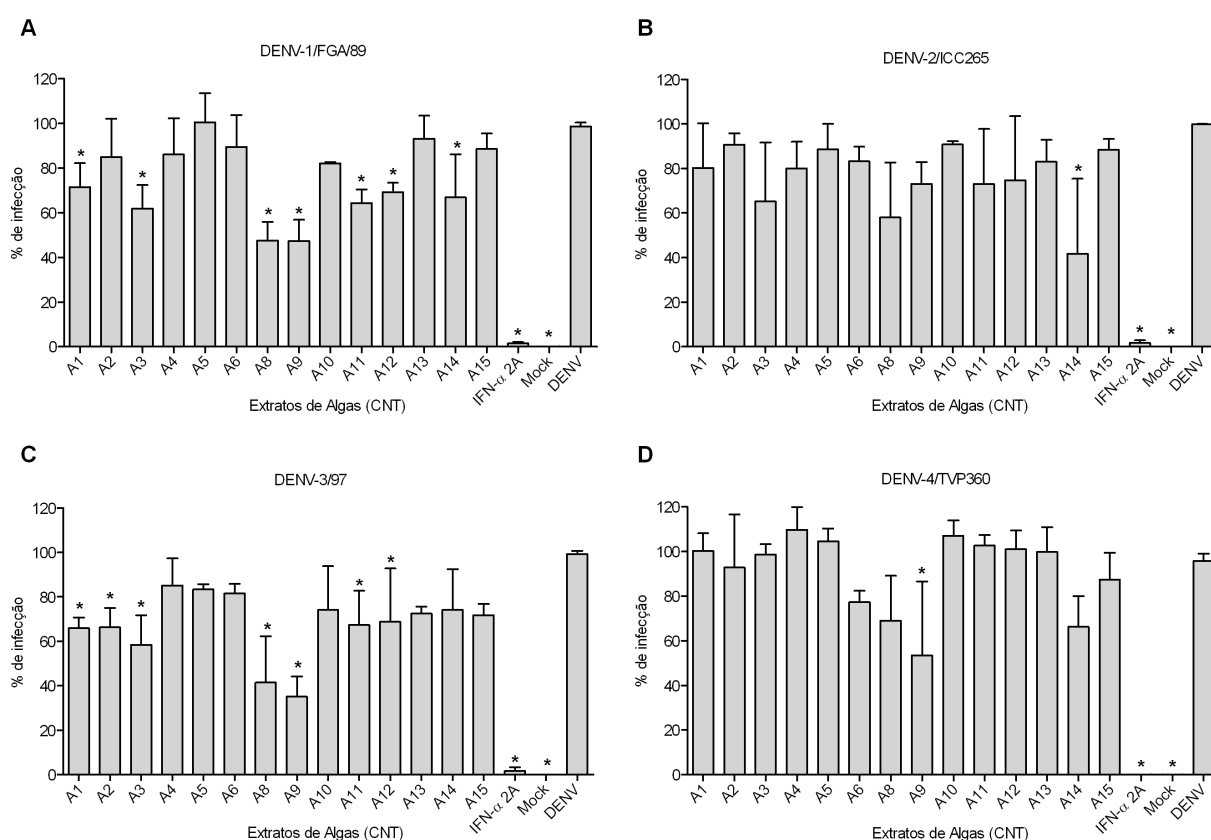


Figura 19 – Triagem dos extratos de macroalgas marinhas pelo ensaio de *in situ* ELISA. Células foram semeadas em placas de 96 poços, após 16h foram infectadas com MOI de 4 para DENV-1, -2 e -3 e MOI de 0,1 para DENV-4. Após 1h30min o inóculo foi retirado e os extratos de macroalgas foram adicionados. Após incubação de 72h as células foram fixadas e reveladas pelo ensaio de *in situ* ELISA. IFN-α 2A foi utilizado como controle. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, * $p < 0,05$.

A fim de determinar se essas diferenças seriam sorotipo ou cepa específica, quatro extratos de algas foram escolhidos, sendo dois do Filo *Phaeophyta* (A1 e A3),

um do Filo *Rhodophyta* (A8) e um do Filo *Chlorophyta* (A12). Estes extratos foram testados contra outras cepas de cada sorotipo, exceto DENV-4, por sua indisponibilidade (Figura 20). Os resultados demonstram que a inibição da infecção por estes extratos, com o tratamento somente após a infecção, parece ser sorotipo e cepa independentes.

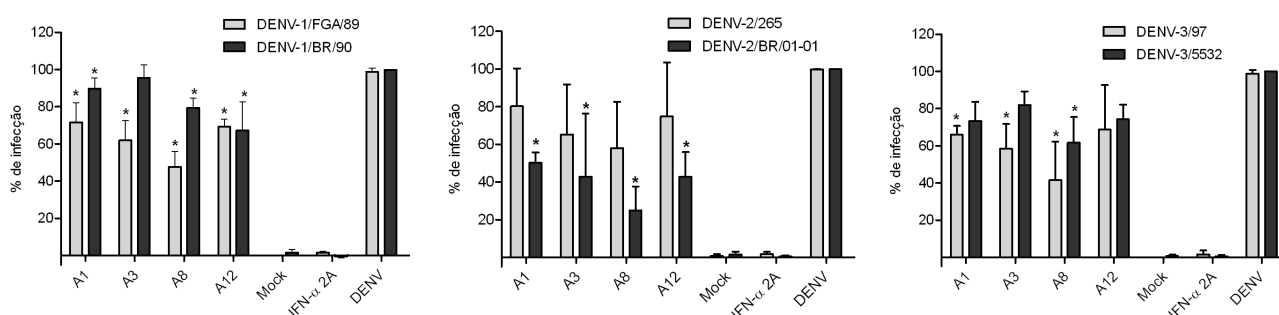


Figura 20 – Inibição da infecção por diferentes cepas/sorotipos de DENV. Células Huh7.5 foram infectadas com cada uma das cepas de DENV, com um MOI de 4 por 1h30min. Em seguida, os extratos de algas foram adicionados e após 72h o *in situ* ELISA foi revelado. IFN-α 2A foi utilizado como controle. Os valores representam média ± DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado (DENV).

Todos os experimentos até este ponto foram realizados com o tratamento somente após a infecção, desta forma poderíamos estar perdendo compostos que agissem em etapas iniciais do ciclo de infecção, como a adsorção e entrada, ou mesmo que apresentassem atividade virucida.

Por este motivo e seguindo o fluxograma proposto na Figura 16, experimentos de tempo de adição foram realizados com os extratos de algas previamente escolhidos e infecção pelo DENV-4, por ser a cepa mais resistente ao tratamento e ter maior disponibilidade de estoque viral. Neste ensaio o tratamento com os extratos foi feito antes da infecção (i), ou seja, um pré-tratamento das células em cultura; durante e após a infecção (ii), cobrindo todas as etapas do ciclo de infecção viral; e apenas após a infecção (iii) como estava sendo realizado até então, que privilegia os extratos que possam atuar em etapas tardias do ciclo viral (Figura 21A). Além dos diferentes tratamentos, os resultados foram avaliados por dois métodos diferentes; o sobrenadante das culturas foi titulado e a infecção das células foi analisada pelo teste *in situ* ELISA.

Os resultados mostram claramente que os extratos testados podem atuar em uma fase inicial do ciclo de infecção viral, tendo em vista que apenas no tratamento durante e após a infecção (tempo 0h) foi possível observar uma forte redução da porcentagem de infecção, tanto pelo ensaio de *in situ* ELISA que quantifica antígeno viral no interior das células, quanto pelo ensaio de imunodeteção de foco que quantifica partículas virais infectivas no sobrenadante da cultura (Figura 21B).

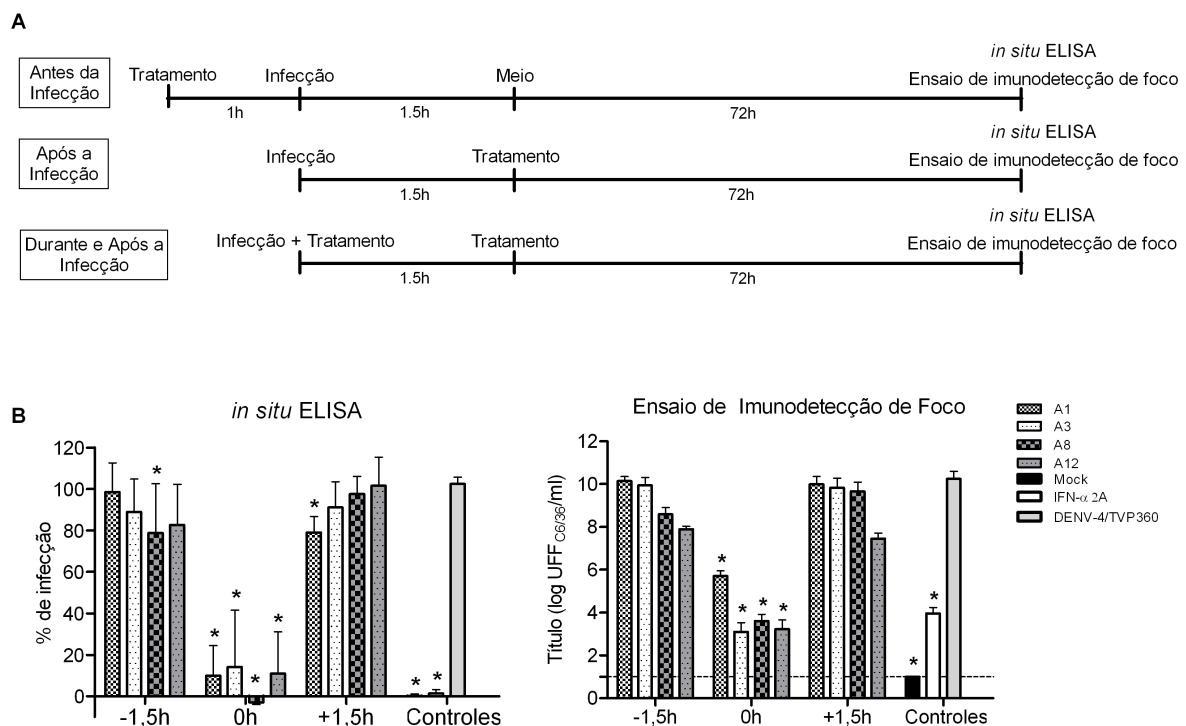


Figura 21 – Ensaio de tempo de adição com os extratos A1, A3, A8 e A12. Células Huh7.5 foram infectadas com DENV-4/TVP360 com um MOI de 0,1 e submetidas aos tratamentos com extratos na CNT, antes da infecção (-1,5 h), durante e após a infecção (0h), e após a infecção (+1,5 h). Após os diferentes tratamentos as células foram incubadas por 72h e submetidas ao ensaio de *in situ* ELISA (A) e o sobrenadante utilizado para o ensaio de imunodeteção de foco (B). A linha tracejada representa o limite de detecção do ensaio de imunodeteção de foco. IFN- α 2A foi utilizado como controle. Os valores representam média \pm DP de três experimentos independentes.

Tendo em vista que o tratamento durante e após a infecção (tempo 0h) mostrou uma taxa de inibição elevada, a curva de concentração resposta (CCR) foi realizada utilizando este tratamento e o CI_{50} e IS foram obtidos (Figura 22). Estes quatro extratos apresentaram valores de IS promissores, comparáveis aos obtidos com tratamento anti-DENV de glicirrizina em células Vero (CRANCE *et al.*, 2003).

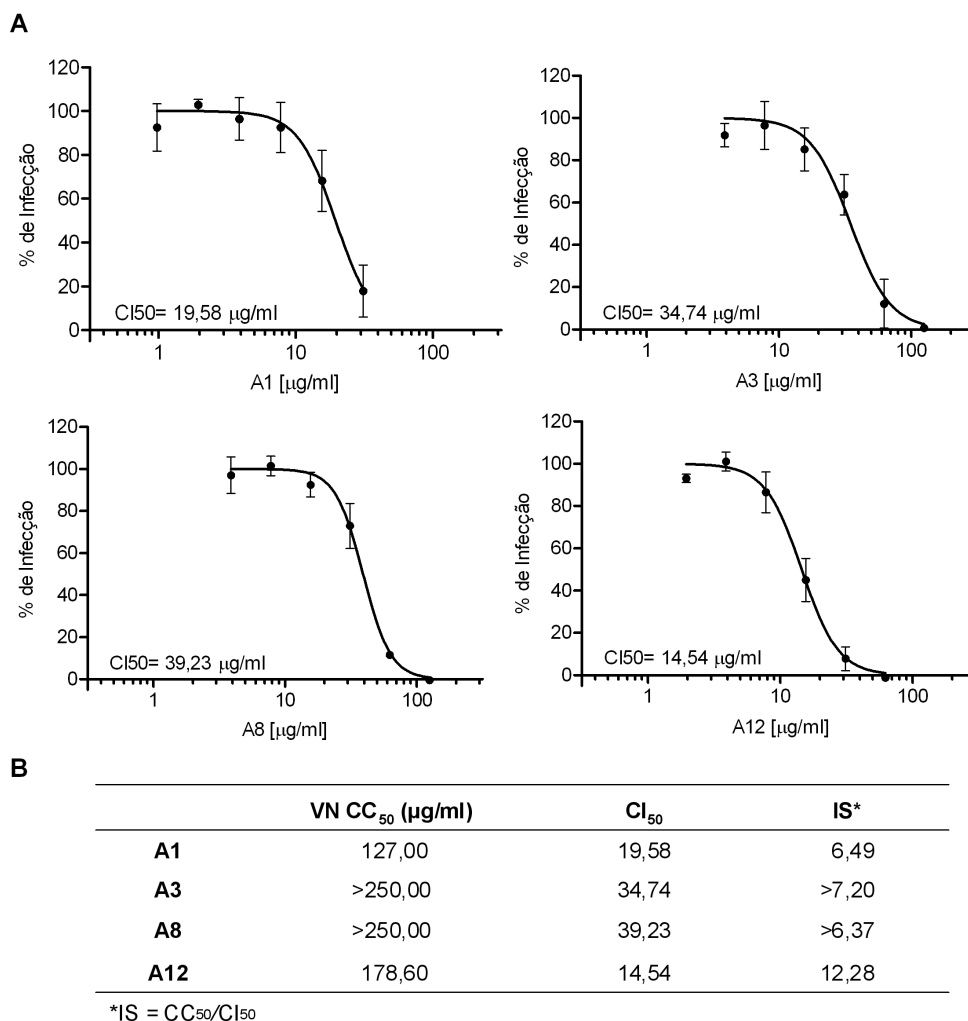


Figura 22 – Curva concentração resposta para os extratos A1, A3, A8 e A12. (A) Células Huh7.5 foram infectadas com DENV-4 (MOI de 0,1), e tratadas durante e após a infecção em uma série de concentrações dos extratos (A). Os valores de CC_{50} , CI_{50} e IS foram calculados (B). Os resultados mostram a média \pm DP de três experimentos independentes.

Partindo para os estudos de determinação de possíveis modos de ação, um possível efeito virucida dos extratos A1, A3, A8 e A12 foi descartado pelo ensaio virucida (Figura 23), no qual nenhum dos tratamentos foi capaz de diretamente atuar sobre a partícula viral. O tratamento com o extrato A1 poderia ser considerado como parcialmente virucida por apresentar uma banda mais fraca na eletroforese em gel de agarose. Entretanto, como este não é uma ensaio quantitativo, essa afirmação deve ser confirmada por outros experimentos.

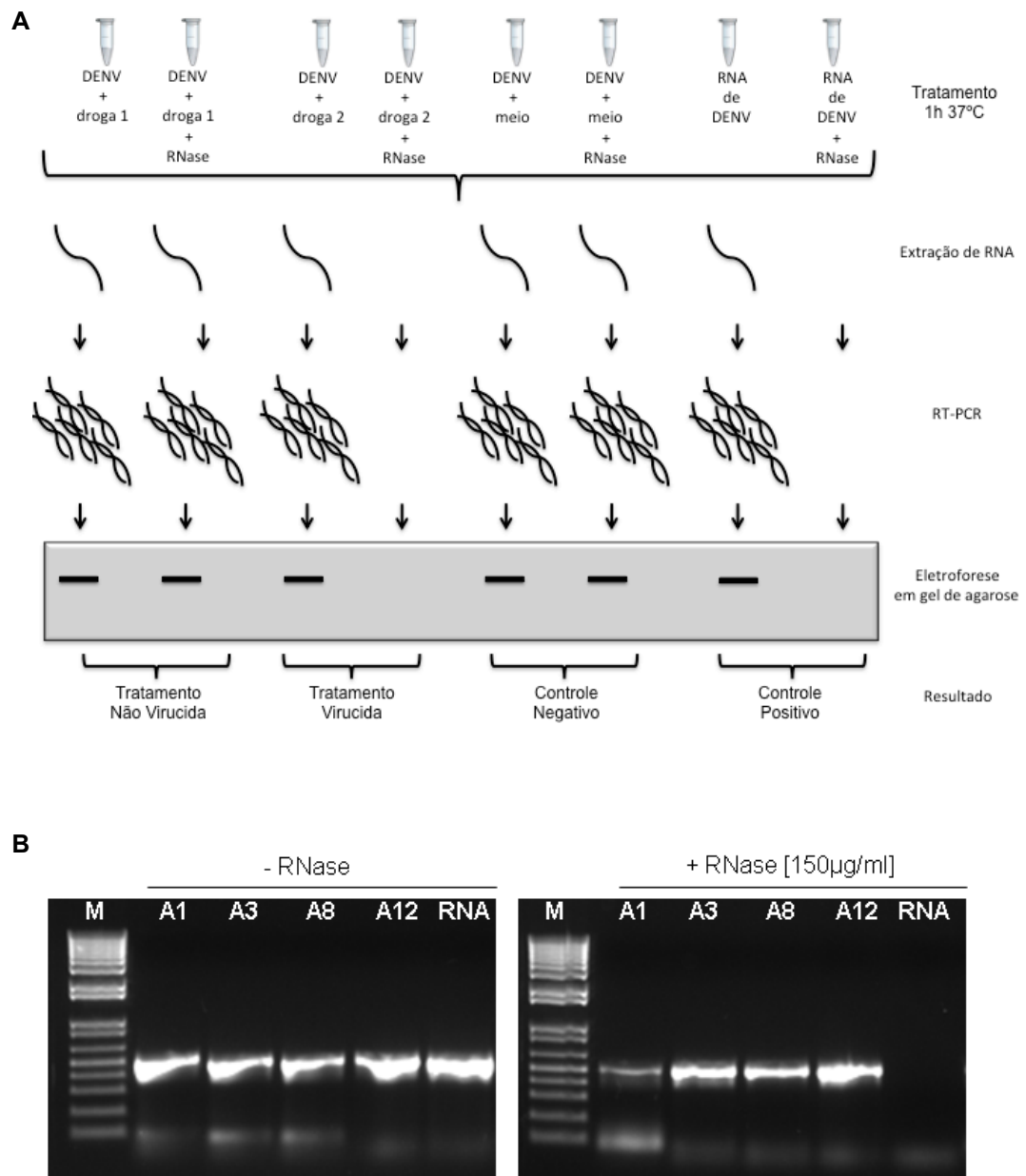


Figura 23 – Ensaio virucida. Representação esquemática do ensaio (A). DENV-4/TVP360 foi incubado com os extratos A1, A3, A8 e A12 na CNT, na presença ou ausência de RNase. Após 1h de incubação a 37°C, o RNA foi extraído e submetido a RT-PCR e eletroforese em gel de agarose. Dados representativos de três experimentos independentes (B).

Além disso, estes quatro extratos foram testados em ensaios de adsorção e internalização (Figura 24). Em conjunto, os resultados apontam que para os extratos A1 e A3 a maior inibição ocorre durante o processo de adsorção viral, com uma menor inibição durante a internalização do vírus na célula. Para os extratos A8 e

A12, parece que ambas as etapas são inibidas. Nos dois experimentos o anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado como controle, por ser neutralizante e recobrir a superfície da partícula viral, impede que a mesma adsorva à célula e/ou dificulta a internalização e fusão de membranas para a liberação do genoma viral no interior do citoplasma celular.

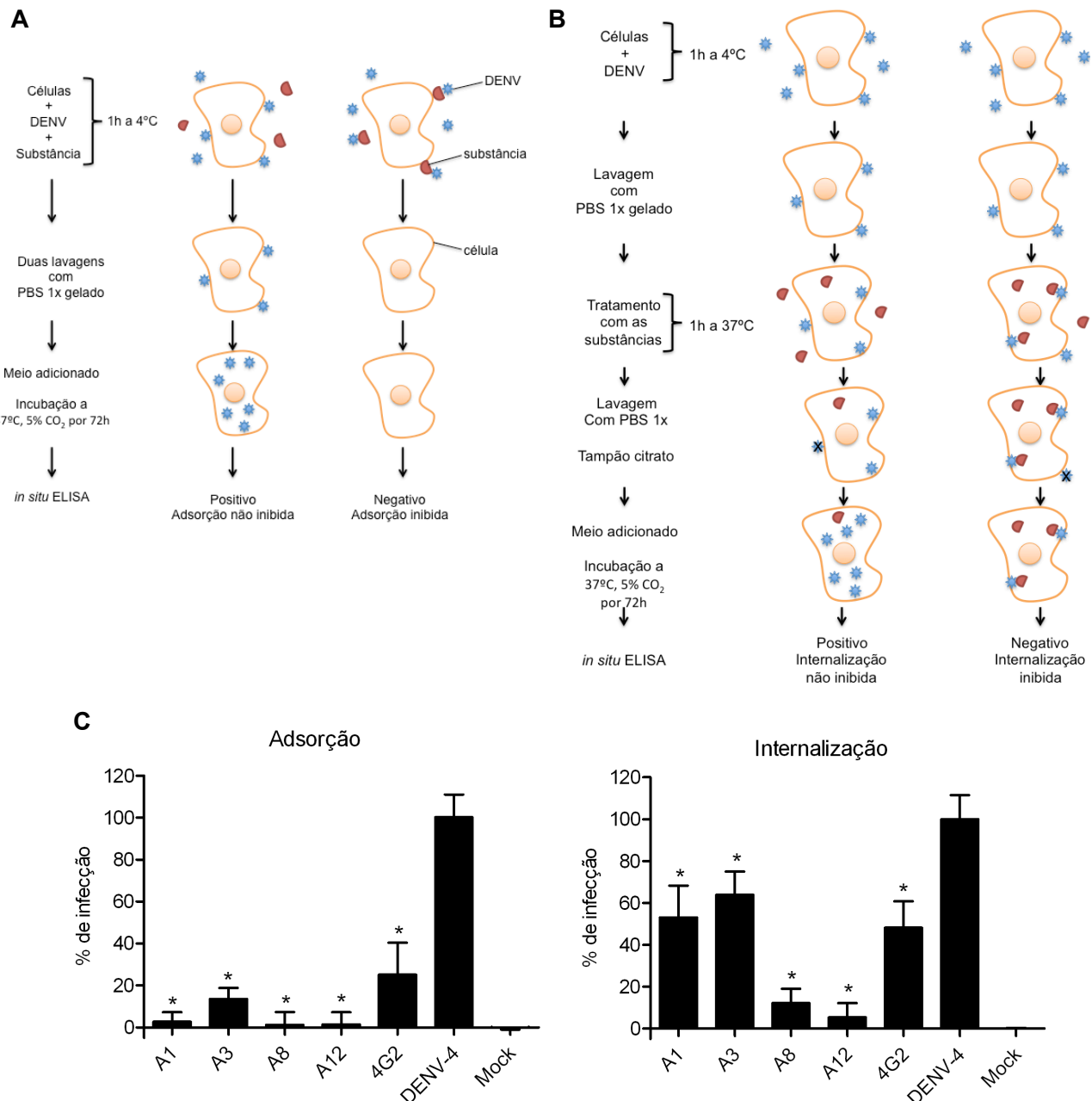


Figura 24 – Representação esquemática dos ensaios de adsorção (A) e internalização (B). Efeito dos extratos A1, A3, A8 e A12 no processo de entrada na célula pelo DENV-4. Ensaio de inibição de adsorção viral e ensaio de inibição de internalização do vírus da dengue (C). O anticorpo 4G2 foi utilizado como controle. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle infectado e não tratado (DENV-4).

4.4 TRIAGEM ANTIVIRAL DE SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS

Um painel de 49 substâncias químicas sintéticas foi gentilmente cedido pelo Dr. Mauro Vieira Almeida da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As substâncias foram solubilizadas em DMSO 100% em alíquotas variando de 50 mM a 12,5 mM (solução estoque) e armazenadas a -20°C.

Como descrito para os extratos de algas, as 49 substâncias químicas sintéticas purificadas foram submetidas aos dois ensaios de citotoxicidade para avaliação da viabilidade celular em curva de concentração resposta (Apêndice III). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, após 16h foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias em DMSO 1% e incubadas por 72h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período de incubação a viabilidade celular foi analisada e as concentrações não citotóxicas e a CC₅₀ foram obtidas (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentração não citotóxica e CC₅₀ das 49 substâncias químicas sintéticas avaliadas pelos ensaios de MTT e VN.

Substância	CC ₅₀ (μM)		Concentração não tóxica (μM)
	VN	MTT	
ACM 004	13,59	12,87	2
ANV05	8,66	9,26	2
ANV06	3,27	2,38	2
ANV08	7,12	3,03	2
BAN21C	36,31	14,72	10
BAN22	17,76	12,71	10
BAN26	14,84	7,50	2
BAN27	37,56	12,61	10
EPA27	113,50	27,58	10
EPA35	9,81	10,06	2
EPA63	162,30	139,70	50
EPA91	73,21	63,12	10
FAB40	48,33	48,74	10
FAB47A	59,65	47,92	10
FAB50	>250,00	>250,00	125

continua

continuação

Substância	CC ₅₀ (µM)		Concentração não tóxica (µM)
	VN	MTT	
GIB24	58,23	32,81	10
GIB25	12,18	11,61	2
LSF23	>250,00	11,70	10
LSF24	60,58	11,08	2
LSF30	6,49	8,49	2
LSF31	7,24	10,12	2
LSF32	158,80	31,87	10
LSF33	40,17	13,15	2
LSF35	>250,00	94,26	10
TAC01	18,62	35,39	10
TAC02	25,74	16,02	0,4
TAC06	3,00	2,55	2
TAC10	197,30	> 250,00	125
TAC12	> 250,00	> 250,00	125
TAC13	4,86	8,14	2
TAC16	5,39	5,11	2
WIL02	187,70	> 250,00	10
WIL04	256,70	> 250,00	125
WIL08	288,50	> 250,00	125
WIL12	195,90	230,20	50
WIL17	103,20	137,60	10
WIL18	62,37	57,57	2
WIL21	46,24	52,98	10
WIL31	258,6	> 250,00	125
WIL36	> 250	> 250,00	250
WIL37	> 250	> 250,00	125
WIL38	274,2	257,10	50
WIL42	117,8	125,80	50
WIL45	> 250	> 250,00	250
WIL57	> 250	> 250,00	250
WIL61	159,60	181,20	125
WIL62	159,00	96,09	10
WIL64	> 250,00	> 250,00	125
WIL 79	> 250,00	> 250,00	125

Após a etapa de determinação da concentração não citotóxica de cada substância, estas foram submetidas à triagem antiviral pelo ensaio de *in situ* ELISA, utilizando-se a cepa DENV-1/FGA/89 para a prova de conceito e o tratamento durante e após a infecção para abordar todas as etapas do ciclo viral (Figura 25). Em todas as placas o IFN- α 2A na concentração de 100 UI/mL foi utilizado como controle, além dos controles não tratado e não infectado. Um total de 15 substâncias: TAC01, TAC02, TAC06, TAC10, TAC12, TAC13, TAC16, WIL37, WIL57, WIL61, ANV06, ANV08, BAN21C, BAN27 e LSF23 foram selecionadas como *hits* por apresentar em média de redução da infecção por DENV-1/FGA/89 igual ou superior a 70%.

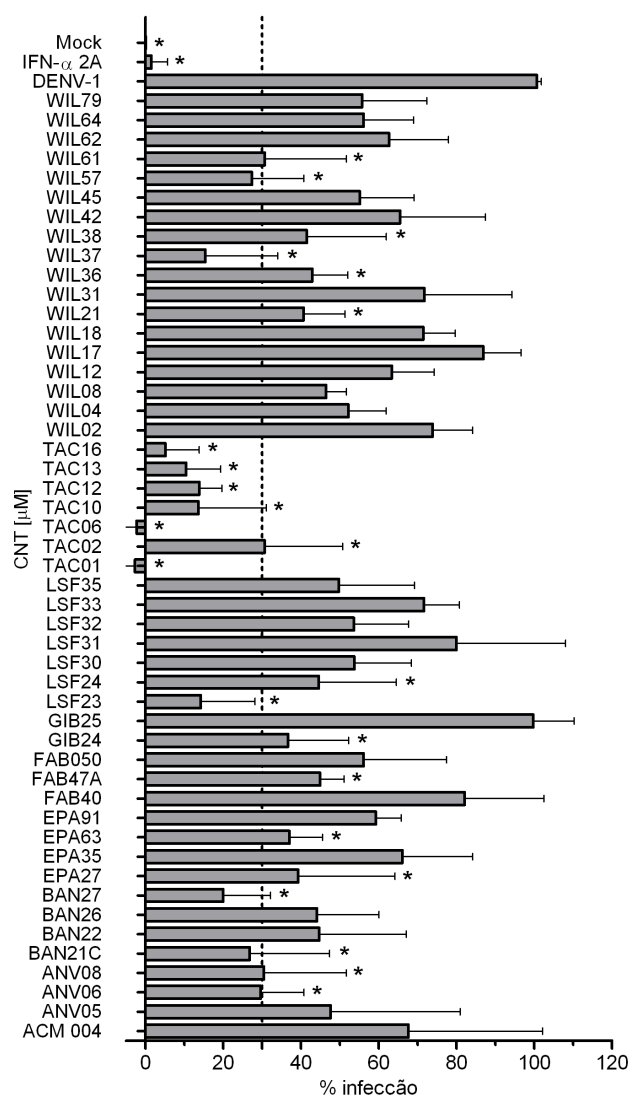


Figura 25 – Triagem da atividade antiviral do painel de substâncias químicas sintéticas. Culturas de Huh7.5 foram submetidas a tratamento durante e após a infecção por DENV-1/FGA/89 em placas de 96 poços. Após 72h as células foram fixadas e o *in situ* ELISA revelado. IFN- α 2A foi utilizado como controle. O resultado corresponde a três experimentos independentes em triplicata. A linha pontilhada corresponde a 30% de infecção, critério utilizado para a escolha de *hits*. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado (DENV-1).

Estas 15 substâncias selecionadas foram então submetidas a ensaios de curva de concentração resposta em células Huh7.5 com diluição seriada 1:2 em um total de seis pontos e infecção pelo DENV-1/FGA/89 (Figura 26). Com este resultado foi possível determinar a CI_{50} e calcular o IS para cada substância (Tabela 7).

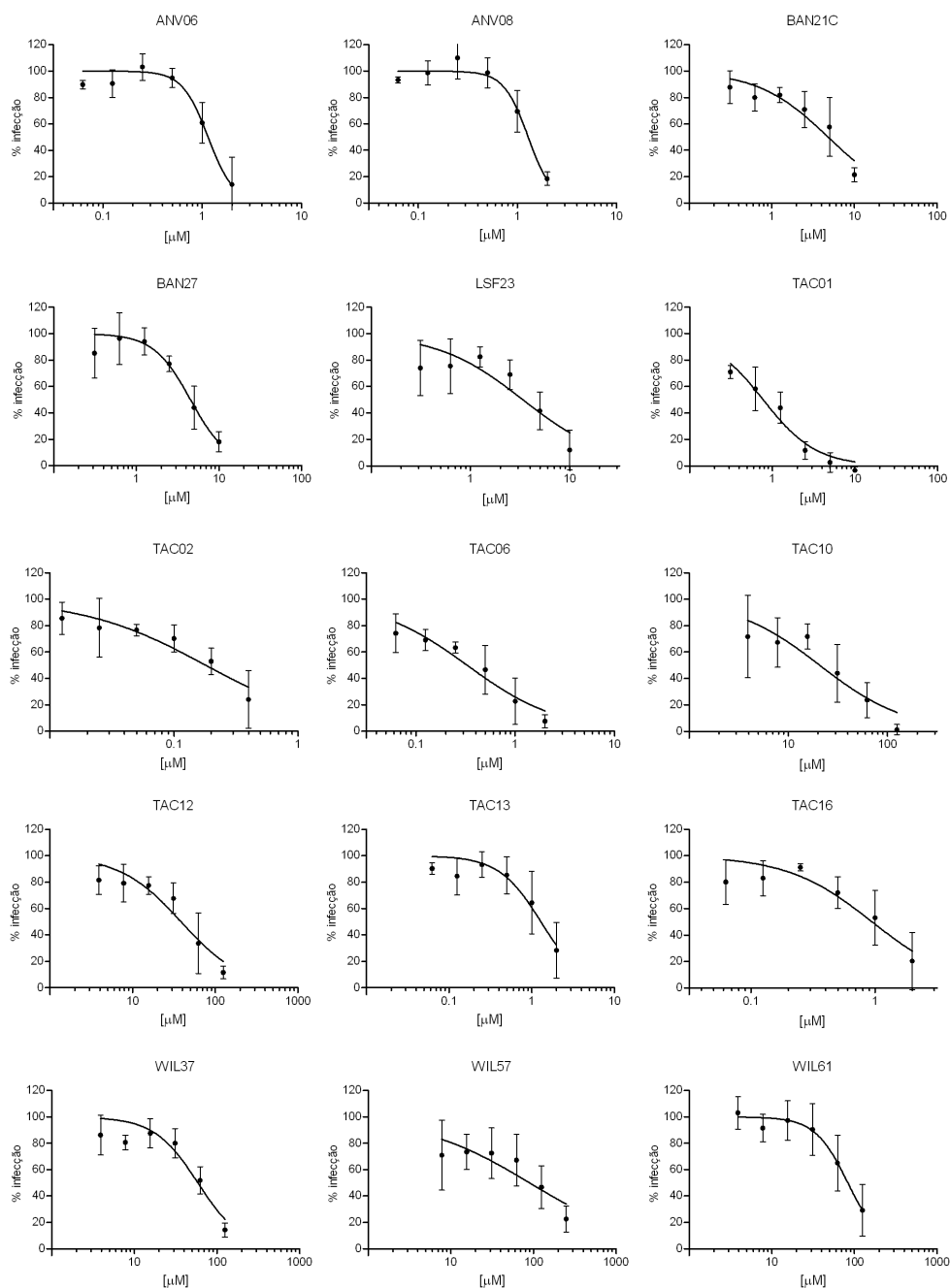


Figura 26 – Curva de concentração resposta das 15 substâncias sintéticas selecionadas como *hits*. Culturas de Huh7.5 foram submetidas ao tratamento durante e após a infecção por DENV-1/FGA/89 com concentrações crescentes de cada substância selecionada. Após 72h as células foram fixadas e o ensaio de *in situ* ELISA revelado. Os resultados correspondem a três experimentos independentes em triplicata.

Tabela 7 – CI_{50} e IS das 15 substâncias sintéticas selecionadas.

Substância	CI_{50}	IS	
		MTT*	VN*
TAC01	0,78	<u>45,54</u>	<u>23,96</u>
TAC02	0,18	<u>88,61</u>	<u>142,37</u>
TAC06	0,33	<u>7,77</u>	<u>9,15</u>
TAC10	20,80	<u>12,02</u>	<u>9,49</u>
TAC12	38,51	<u>6,49</u>	<u>6,49</u>
TAC13	1,29	<u>6,30</u>	3,76
TAC16	0,95	<u>5,39</u>	<u>5,69</u>
WIL37	58,77	4,25	4,25
WIL57	89,87	2,78	2,78
WIL61	83,38	2,17	1,91
ANV06	1,15	2,07	2,84
ANV08	1,29	2,36	<u>5,54</u>
BAN21C	4,82	3,06	<u>7,54</u>
BAN27	4,53	2,79	<u>8,30</u>
LSF23	3,38	3,46	<u>74,03</u>

*As substâncias com IS maior que cinco estão sublinhadas.

Os índices de seletividade variaram de 1,91 a 142,37, com certa variação, quando considera-se o valor de CC_{50} pelo ensaio de MTT ou VN. Com o critério de escolha de IS igual ou maior que cinco, onze substâncias foram selecionadas, sendo oito (TAC01, TAC02, TAC06, TAC10, TAC12, TAC13, TAC16 e LSF23) pertencentes a mesma classe química, antraquinonas obtidas a partir da 1,4-dihidroxi-antraquinona (Figura 9).

Com intuito de testar estas oito substâncias em um sistema mais próximo à realidade, optou-se pela utilização de culturas primárias de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de doadores humanos saudáveis, para constatar se ocorreria a mesma inibição de infecção observada nas células de linhagem Huh7.5. Para isso, culturas de PBMCs de três doadores foram submetidas a infecção pela cepa DENV-4/ TVP360 e tratamento durante e após a infecção com as substâncias em uma concentração quatro vezes menor que a CNT obtida para a linhagem Huh7.5. Após cinco dias, as células foram recuperadas e marcadas para o ensaio de apoptose e para a presença de antígeno viral.

O ensaio de morte celular mostra que após os cinco dias de cultivo, cerca de 65% das células estão viáveis na amostra controle (infectado e não tratado), sendo este valor definido como 100% de viabilidade celular do experimento para fins de comparação aos demais tratamentos. A análise dos dados mostra que a substância LSF23 não induziu apoptose, e TAC02, TAC12, TAC16 induziram minimamente a apoptose nas condições testadas. Por outro lado, as substâncias TAC01 e TAC10 induziram um aumento na população duplo marcada (Anexina V⁺ e 7AAD⁺) indicando morte celular por necrose ou apoptose tardia; e para TAC06 e TAC13 apenas a apoptose foi induzida (Figura 27).

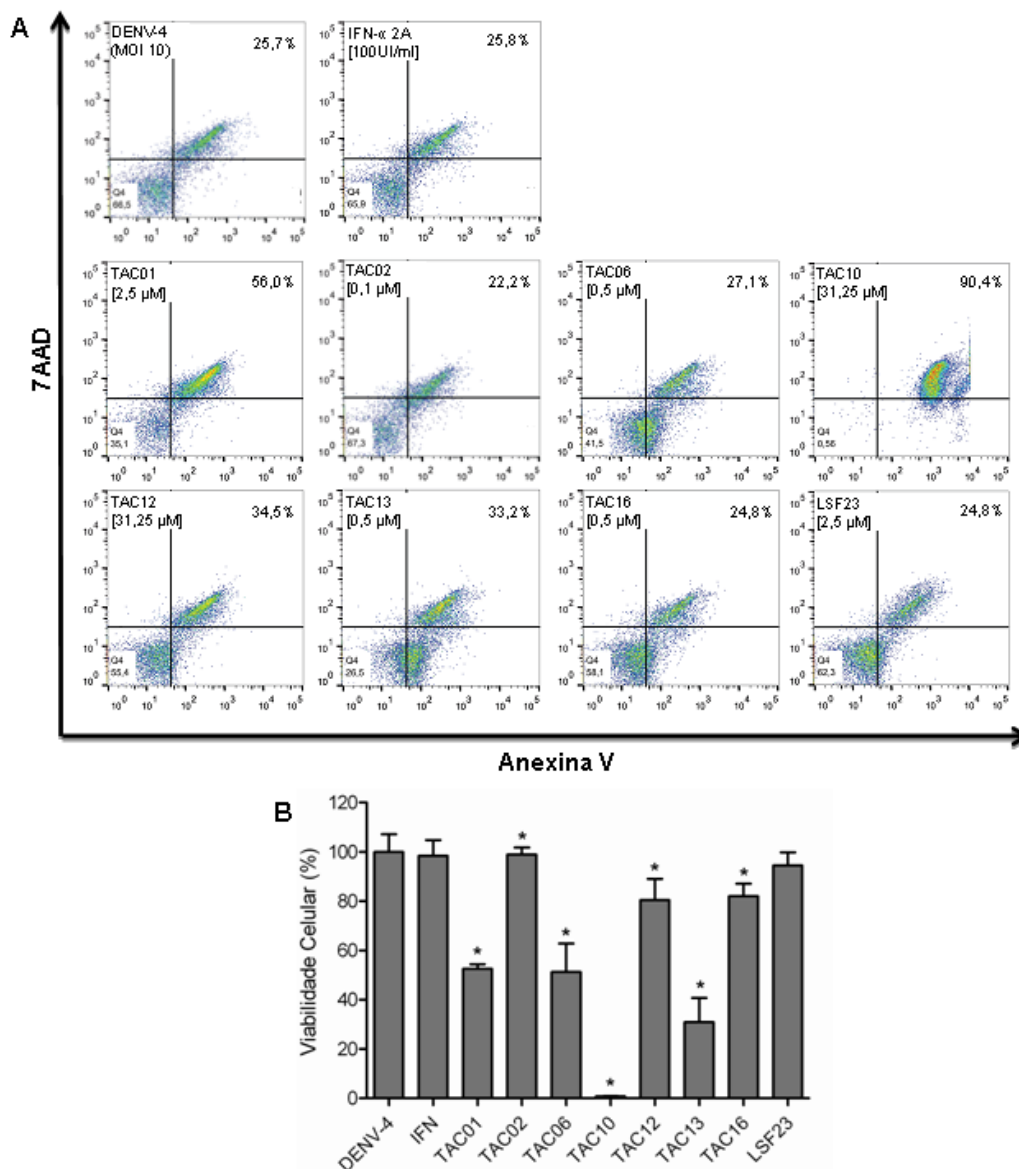


Figura 27 – Ensaio de apoptose em culturas de PBMC tratadas durante e após a infecção pelo DENV-4/TVP360 por cinco dias. Gráficos de pontos representativo de um doador (A). Valores relativos de viabilidade celular referentes aos dados dos três doadores humanos saudáveis (B). IFN- α 2A foi utilizado como controle. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

A marcação para a presença de antígeno viral (proteína E) foi positiva em 38,8%; 8,43% e 8,85% das PBMCs de cada doador, e as substâncias foram capazes de diminuir a porcentagem de células infectadas a níveis comparados ao IFN- α 2A, utilizado como controle (Figura 28). Vale ressaltar que as análises foram realizadas tentando excluir as células inviáveis e tendo como referência o mock de cada tratamento, apesar disso deve ser levado em consideração que as substâncias TAC01, TAC06, TAC10 e TAC13 apresentaram toxicidade elevada na concentração testada e devem ser avaliadas em concentrações menores.

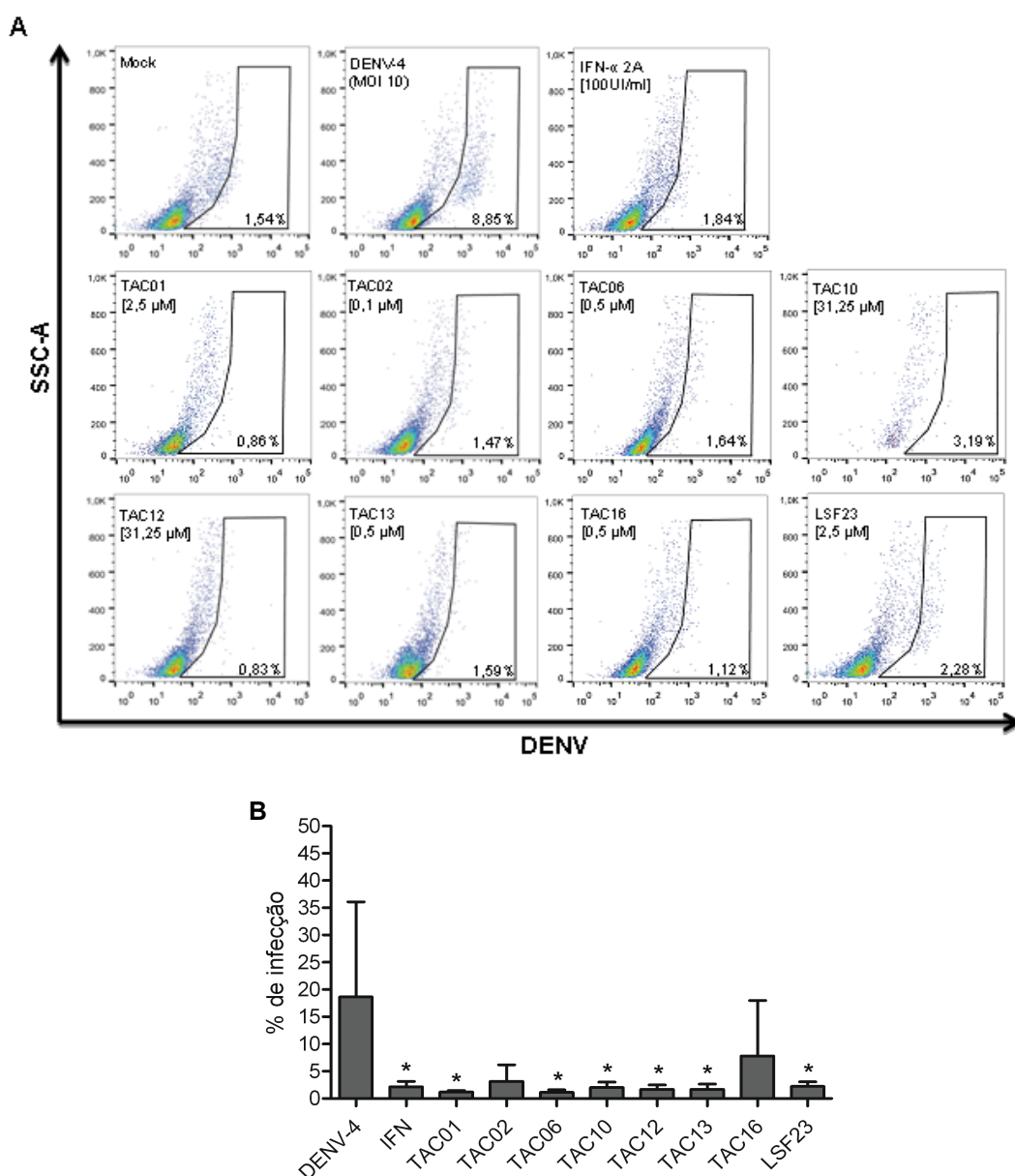


Figura 28 – Ensaio de infecção em culturas de PBMCs tratadas durante e após a infecção pelo DENV-4/TVP360 por cinco dias. Gráficos de pontos representativo de um doador (A). IFN- α 2A foi utilizado como controle. Valores relativos de porcentagem de infecção referentes aos dados dos três

5 DISCUSSÃO

A dengue consolidou-se como a arbovirose de maior importância de saúde pública no mundo, com número crescente de casos graves e ampla distribuição dos quatro sorotipos do vírus em áreas endêmicas na Ásia, África e Américas (GUZMAN *et al.*, 2010; MESSINA *et al.*, 2014). Com o aumento alarmante do número de casos de FHD/SCD a cada ano, a demanda por medidas preventivas ou terapêuticas contra o DENV vem aumentando rapidamente. Progressos significativos foram alcançados no desenvolvimento de uma vacina para dengue, inclusive com teste clínico de fase III com a candidata *ChimeriVax* da *Sanofi Pasteur* (Tabela 2), entretanto sua eficácia e segurança a longo prazo ainda necessitam de avaliação. Neste contexto, uma nova abordagem que gradualmente está despertando interesse é o desenvolvimento de antivirais para dengue.

A triagem de atividade antiviral de substâncias químicas pode ser realizada utilizando diversas abordagens, sendo que todas possuem vantagens e desvantagens. Por exemplo, o teste utilizado pode ser com ou sem um alvo específico definido; e em relação ao rendimento, pode ser um ensaio de alta ou baixa performance.

A triagem antiviral sem escolha de alvos, utilizando ensaios celulares, pode ser vantajosa por considerar todas as etapas do ciclo de infecção, o que pode aumentar a taxa de sucesso. Entretanto, ensaios adicionais são necessários para determinar o modo de ação da molécula, que pode ser em qualquer etapa do ciclo (CRUZ *et al.*, 2013; SHUM *et al.*, 2010). Uma forma de se determinar o alvo específico que foi inibido pela molécula em teste é a realização de várias passagens do vírus na presença da substância, e o isolamento de variantes virais resistentes, que podem ser sequenciadas e comparadas ao vírus parental, identificando assim alterações no genoma viral que correlacionam com a resistência ao tratamento (BYRD *et al.*, 2013a; CLEEF *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2011).

Na triagem com alvo definido, a chance de se encontrar uma molécula ativa é menor, por excluir grande parte das etapas do ciclo viral. Por outro lado, em caso positivo, o modo de ação dessa molécula está praticamente determinado. Além de ensaios bioquímicos de atividade de enzimas, um outro exemplo desse tipo de abordagem são as triagens *in silico* (via simulações computacionais) em larga

escala, tendo como alvo proteínas que possuem suas estruturas cristalizadas, como a proteína E, tornando possível a triagem de um grande número de moléculas, resultando em poucos alvos potenciais que então são testados em ensaios celulares (KAMPMANN *et al.*, 2009; POH *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009).

Em relação ao rendimento do teste, há ensaios de baixo desempenho, como o ensaio de redução de placa que apesar de trabalhoso, demorado e ter uma medição subjetiva ainda é muito utilizado (ALHOOT *et al.*, 2013; HIDARI *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2012). Por outro lado, existem diversos ensaios de alto desempenho relatados para a triagem de substâncias anti-dengue (CHE; WANG; LI, 2009; CRUZ *et al.*, 2013; QING *et al.*, 2010; SHUM *et al.*, 2010), que são quantitativos e capazes de testar um grande número de substâncias simultaneamente. Entretanto, como geralmente utilizam novas tecnologias como equipamentos, robôs e programas de computador que são custosos, ficam restritos aos laboratórios de companhias farmacêuticas e centros especializados.

Na tentativa de contornar essas dificuldades, alguns pesquisadores propuseram um ensaio de *in situ* ELISA para a triagem de agentes antivirais para o vírus Influenza A (MYC; ANDERSON; BAKER, 1999); vírus varicela zoster (BERKOWITZ; LEVIN, 1985) e citomegalovírus humano (LJUNGDAHLSTAHLE *et al.*, 1998). Yin *et al.* (2009) definiram um *in situ* ELISA como Ensaio de Imunodeteção de *Flavivirus* baseado em célula, e o utilizaram para a triagem da atividade antiviral de 111 substâncias na linhagem celular A549. O mesmo ensaio foi usado posteriormente para determinar a inibição da síntese de RNA do DENV por um nucleosídeo de adenina (CHEN *et al.*, 2010a) e uma pró-droga de um análogo da adenosina (CHEN *et al.*, 2010b).

Com base neste cenário, foi proposto neste estudo uma abordagem simples, de média escala, sem alvo específico para a descoberta de drogas contra o DENV em linhagem de células humanas Huh7.5. Para isso, a triagem de potenciais candidatos antivirais para dengue foi feita utilizando o método de *in situ* ELISA que quantifica a presença da glicoproteína viral E no interior de células infectadas através de imunomarcagem e reação colorimétrica, que pode ser adaptado para automação e fornece resultados rápidos e objetivos, fazendo uso de materiais e reagentes comuns para grande parte dos laboratórios (Apêndice IV).

Estudos anteriores asseguram que o nível de proteína E reflete o nível da produção de partículas infecciosas e que uma diminuição na produção desta proteína poderia indicar uma redução de entrada viral, replicação do genoma, ou tradução e processamento de proteínas (SHUM *et al.*, 2010).

Para obter melhores resultados, vários aspectos do ensaio de *in situ* ELISA foram otimizados, pois são as etapas básicas para o desenvolvimento de um teste (CHE; WANG; LI, 2009). Os resultados mostraram que metanol:acetona para fixação de células, PBS leite 2% para o bloqueio de reações inespecíficas, a densidade de 2×10^4 células por poço, MOI 4 para DENV-1, -2 e -3, e 0,1 para DENV-4 em 72h de infecção seriam as melhores escolhas para o teste em placas de 96 poços.

A validação deste ensaio foi feita através da comparação dos resultados obtidos com outros dois ensaios, o de formação de foco e um teste ELISA comercial de captura do antígeno NS1, que é produzido e liberado no meio extracelular. Demonstrou-se que o *in situ* ELISA foi capaz de quantificar a diminuição da infecção pelo tratamento com IFN- α 2A, assim como os outros dois ensaios, sendo uma ferramenta confiável para a realização de triagens antivirais.

No entanto, o *in situ* ELISA possui limitações. Por ser um ensaio celular pode haver variações poço a poço; requer o uso de anticorpos; múltiplas lavagens; e a quantidade de células infectadas na cultura deve ser alta o suficiente para ser detectada, algo que pode variar conforme a cepa viral utilizada. Além disso, os resultados de triagem antiviral podem ser influenciados pela quantidade de células presentes no poço que pode ser alterada quando a substância é citotóxica. Dessa maneira, foram realizados os ensaios de viabilidade celular MTT e VN, previamente à triagem antiviral, para garantir que o efeito observado não seria devido a citotoxicidade das substâncias.

Os testes de MTT e VN foram escolhidos por avaliarem a viabilidade celular de formas distintas, e dessa forma garantir a escolha de uma concentração segura. O MTT avalia a entrada e redução dos cristais de formazana por células viáveis com redutases mitocondriais ativas, e o VN é baseado na capacidade da célula viável de manter gradientes de pH através da produção de ATP.

Os resultados obtidos indicaram que o ensaio de VN parece ser mais sensível que o de MTT, por apresentar valores mais elevados de DO mesmo com reduzido número de células (Figura 18), corroborando com um estudo prévio que mostra que VN apresenta menos interferência, é mais sensível, além de não utilizar

reagentes instáveis como os necessários para os testes de viabilidade que usam sais de tetrazólio (MTT, MTS e XTS) (BORENFREUND; BABICH, 1988). Para os testes de atividade antiviral foram escolhidas as primeiras concentrações não tóxicas obtidas nos dois testes pela CCR, quando houve discrepância entre os ensaios, a menor concentração foi considerada.

Com esta abordagem combinada de ensaios foi possível triar produtos naturais e substâncias químicas sintéticas. A estratégia de triar dois painéis de origens distintas teve como objetivo aumentar a chance de sucesso na busca por um candidato anti-DENV.

A colaboração com o químico Dr. Everson Miguel Bianco nos deu a oportunidade de trabalhar com extratos de macroalgas marinhas, um valioso material coletado na costa brasileira e que, para nosso conhecimento, não havia sido testado para atividade anti-DENV anteriormente. Dentre os extratos de algas avaliados, um foi altamente tóxico (A7) e foi excluído dos testes antivirais. Estudos mostram que alguns extratos ou compostos isolados de algas marinhas são tóxicos para células cancerosas (KHANAVI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010). Por outro lado os extratos A2, A3, A8 e A11 apresentaram baixa toxicidade para a linhagem celular Huh7.5, sendo utilizados na triagem juntamente com os extratos A1, A4, A5, A6, A9, A10, A12, A13, A14 e A15 de toxicidade média.

Dentre os quatorze extratos testados para atividade antiviral, oito apresentaram certo grau de inibição da infecção pelo DENV, quando comparados aos controles, com variação da atividade dependendo do sorotipo do vírus. A homologia de aminoácidos entre os sorotipos de DENV é de cerca de 70% (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), representando um desafio encontrar uma substância que iniba todos os quatro sorotipos/ genótipos com a mesma eficácia.

Um estudo com dois polissacarídeos sulfatados obtidos a partir das algas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* mostrou que a atividade antiviral contra o DENV foi dependente do sorotipo e da célula hospedeira. Demonstrou-se uma inibição considerável da multiplicação de DENV-2 em células Vero, com menor efeito contra DENV-3 e DENV-4, e nenhum efeito contra DENV-1 (TALARICO *et al.*, 2005). Hidari *et al.* (2008) relatam um estudo com o polissacarídeo sulfatado denominado fucoidan que apresentou uma potente inibição no pré-tratamento de DENV-2, entretanto nenhum efeito foi observado com os demais sorotipos do vírus.

Dentre os oito extratos de algas que apresentaram atividade antiviral, quatro foram escolhidos, sendo dois do Filo *Phaeophyta* (A1 e A3), um do Filo *Rhodophyta* (A8) e um do Filo *Chlorophyta* (A12) por inibir a infecção por DENV-1 e -3 no tratamento após a infecção, e pela disponibilidade de maior quantidade do extrato para a realização de testes complementares.

Uma vez determinada a inibição da infecção pelo DENV, ensaios que poderiam indicar modos de ação foram realizados, como experimentos de tempo de adição do extrato. Os resultados utilizando o ensaio de *in situ* ELISA e de imunodeteção de foco mostraram uma forte inibição do DENV no tratamento durante a infecção, que não está presente nos tratamentos antes ou após a infecção (Figura 21).

Esta inibição da replicação viral e/ou expressão de antígenos virais apenas no tratamento durante a infecção, que é perdida quando o tratamento é realizado horas ou em alguns casos minutos após a infecção, é um indicativo que o modo de ação da substância ocorra em uma etapa inicial do ciclo de replicação viral (entrada do vírus na célula), como a adsorção, endocitose mediada por receptores, fusão de membranas dependente de pH, descapsulamento ou mesmo atividade virucida (DE BURGHGRAEVE *et al.*, 2012). Harden *et al.* (2009) avaliaram a atividade antiviral de extratos de *Undaria pinnatifida*, *Splachnidium rugosum*, *Gigartina atropurpurea*, e *Plocamium cartilagineum* contra HSV-1 e -2. Estes exibiram boa atividade inibitória quando adicionados durante a primeira hora de infecção viral, mas foram ineficazes quando adicionados mais tardiamente. Ensaios subsequentes mostraram que os mesmos apresentavam atividade virucida potente e eram ativos em concentrações muito baixas.

Dessa forma, visando definir o modo de ação dos extratos de algas, foram realizados testes virucida, e ensaios de adsorção e internalização viral. Nenhum dos extratos apresentou atividade virucida, ou seja, ação direta na partícula viral. Os resultados destes ensaios em conjunto indicam que para os extratos A1 e A3 ocorre inibição da infecção durante o processo de adsorção viral, com uma menor inibição durante a internalização do vírus na célula. Para os extratos A8 e A12 ambas as etapas são inibidas. No entanto, são necessários mais testes para a identificação do alvo específico que está sendo inibido ou modulado por esses extratos.

Em relação à composição química dos extratos das algas escolhidas, em um estudo prévio realizado com duas populações da alga *Canistrocarpus cervicornis*

(fonte de A1) utilizando o método de extração por diclorometano/metanol, de um total de 14 diterpenos isolados, foram detectados dolastanos, ecodolastanos e secodolastanos. Os resultados obtidos revelaram um padrão típico para *C. cervicornis* que não variou de acordo com a região geográfica (OLIVEIRA *et al.*, 2008). De *Padina gymnospora* (fonte de A3) somente algumas classes de metabólitos foram isoladas até o momento, tais como ácidos graxos (FERREIRA *et al.*, 2012), e polissacarídeos sulfatados (MARQUES *et al.*, 2012). De *Palisada perforada* (fonte de A8) apenas dois álcoois triquinanos foram descritos (FUJII *et al.*, 2011). A partir do gênero *Caulerpa* (fonte de A12) foram previamente isolados ácidos graxos, esteróides, terpenos e alcalóides (ALIYA; SHAMEEL, 2003).

Os quatro extratos de algas A1, A3, A8 e A12 estudados aqui apresentaram uma importante atividade anti-DENV em células humanas Huh7.5, atuando na etapa de entrada do vírus na célula. É de extrema importância a identificação das moléculas responsáveis por essa atividade antiviral, para que assim sejam possíveis estudos mais específicos de mecanismos de ação e em modelo *in vivo*, descartando a possível citotoxicidade de substâncias não relacionadas e aumentando a potência da ação antiviral.

Algumas das desvantagens de se trabalhar com extratos de produtos naturais são as pequenas quantidades disponíveis para testes, a variação entre lotes e a complexa identificação e isolamento de seus componentes, que torna difícil atribuir a atividade biológica descoberta a uma única molécula, o que não acontece para substâncias químicas sintéticas obtidas em laboratório (FREARSON; COLLIE, 2009).

Assim, também foram realizadas triagens para atividade antiviral de 49 substâncias químicas sintéticas de classes diversas utilizando-se a linhagem celular Huh7.5 infectada com DENV-1. O sorotipo 1 foi inicialmente escolhido por termos disponível no laboratório um clone infeccioso deste sorotipo que permitirá manipulações genéticas do genoma viral para estudos subsequentes de mecanismos de ação das substâncias. Ao final da triagem foram selecionadas oito substâncias aparentemente mais promissoras (TAC01, TAC02, TAC06, TAC10, TAC12, TAC13, TAC16 e LSF23) e que pertencem a mesma classe química, no caso, antraquinonas obtidas a partir da 1,4-dihidroxiantraquinona (Figura 9). A triagem para os demais sorotipos do DENV será realizada em curto prazo.

Estas oito substâncias são análogas à ARDP0006, uma substância descoberta em triagem virtual para inibidores da protease NS2B-NS3 de DENV-2. Neste estudo, os *hits* da triagem foram confirmados por ensaios bioquímicos e celulares em linhagem LLC-MK2, com CI_{50} de 4,2 e CC_{50} de 69 μ M (IS igual a 16,6) (TOMLINSON *et al.*, 2009). Mais recentemente foram testados 23 análogos à ARDP0006 disponíveis comercialmente, sendo que dez foram solúveis e destes quatro demonstraram inibição da atividade da protease NS2B-NS3 significativamente melhor que a substância inicial, e quatro apresentaram inibição similar em teste bioquímico (TOMLINSON; WATOWICH, 2011).

Ao contrário destes dois trabalhos da literatura, que utilizaram moléculas disponíveis comercialmente, em nosso estudo todas as substâncias foram obtidas pelo grupo do Dr. Mauro Vieira de Almeida da Universidade Federal de Juiz de Fora e apresentaram valores de IS até 8 vezes maior que ARDP0006. Esta colaboração ainda permite que outras classes químicas sejam triadas, e a otimização de moléculas promissoras, com o intuito de diminuir a toxicidade e aumentar a atividade antiviral mantendo boas características farmacológicas.

Estudos *in vitro* identificaram monócitos, macrófagos e células dendríticas (KOU *et al.*, 2008; MAROVICH *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2000) como os alvos principais do DENV em humanos. Estas células seriam responsáveis pela disseminação do vírus após sua entrada inicial pela picada de mosquitos infectados. Para a avaliação da atividade antiviral em um sistema celular fisiologicamente mais relevante, as oito substâncias escolhidas foram testadas em culturas de células mononucleares de sangue periférico de três doadores saudáveis.

Por se tratar de uma cultura celular primária e possivelmente mais sensível às substâncias, utilizou-se concentrações quatro vezes menores que a CNT obtida em linhagem Huh7.5. Mesmo assim, as substâncias TAC01, TAC06, TAC10 e TAC13 apresentaram alta indução de apoptose na concentração testada e deverão ser analisadas em concentrações menores.

Como a triagem inicial foi feita utilizando o sorotipo 1, o mesmo vírus foi utilizado para o teste em PBMCs com MOI de 10. Entretanto, não foi possível quantificar a infecção pelo baixo número de células infectadas e consequentemente não haver diferenças entre os controles e tratamentos.

Como relatado anteriormente, estas células são pouco permissivas a infecção pelo DENV *in vitro* mesmo com altos MOIs e a infectividade varia entre os

doadores (KOU *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2012). Para superar esta barreira, Fu *et al.* (2013) desenvolveram um ensaio utilizando uma pré-incubação do vírus com um anticorpo anti-proteína E para melhorar a infectividade de isolados clínicos de DENV-2 em PBMCs e os resultados tiveram correlação com o ensaio convencional de formação de placa. No entanto, a utilização de um anticorpo potencializador da infecção (ADE) pode não representar a melhor maneira para o teste de substâncias antivirais, uma vez que o mecanismo de entrada na célula via ADE é diferente da infecção natural.

Um novo experimento foi realizado com o vírus DENV-4/TVP360 que por ser uma cepa adaptada a cultivo celular, apresentou média de infecção de 18,6% em PBMCs. Os tratamentos com TAC02, TAC12 e LSF23 foram capazes de diminuir a porcentagem de células infectadas a níveis comparados ao do controle IFN- α 2A, e são promissoras para ensaios adicionais de modo de ação. Alves *et al.* (2012) relataram um estudo com o derivado de antraquinona, O,O'-bis-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxiantraquinona, que foi testado em um modelo experimental de encefalomielite autoimune e foi capaz de melhorar os sinais clínicos com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Esta característica imunomoduladora pode ser interessante no caso da dengue e deve ser analisada em modelos *ex vivo* e *in vivo* de infecção pelo DENV.

Desta forma, um modelo animal (camundongo AG129 deficiente para os receptores de interferon- α/β e $-\gamma$) vem sendo usado para o teste de drogas anti-dengue. Com esse modelo de viremia de febre de dengue, foi mostrada a redução da replicação e supressão da resposta inflamatória após o tratamento com as substâncias antivirais 7-deaza-2'-C-metil-adenosina, N-nonil-deoxinojirimicina, e 6-O-butanoil castanospermina (SCHUL *et al.*, 2007). O desenvolvimento e/ou estabelecimento de modelos animais para DENV no ICC/FIOCRUZ-PR são de fundamental importância para a continuidade destes experimentos com antivirais e estão incluídas nas perspectivas do trabalho.

Claramente a solução a longo prazo para o problema atual de dengue no mundo seria a existência de uma vacina segura e eficaz, entretanto estratégias mais imediatas são urgentemente necessárias para o combate da doença, como o desenvolvimento de antivirais. A pesquisa com DENV foi negligenciada por muitos anos, mas o aumento no financiamento e incentivos para a pesquisa básica e

aplicada juntamente com esforços multidisciplinares e parcerias público- privadas podem resultar em uma fármaco para o tratamento da doença em um futuro próximo.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou a padronização e validação de um ensaio de *in situ* ELISA com uma linhagem celular humana (Huh7.5) para a triagem de substâncias antivirais contra todos os sorotipos de DENV. O ensaio constitui um método confiável, de baixo custo e em média escala para a triagem de inibidores da infecção por DENV em células de mamíferos e está de acordo com resultados obtidos por outras técnicas de quantificação viral. Ambos os pontos de partida para a triagem antiviral, produtos naturais e substâncias químicas sintéticas resultaram em candidatos com potencial atividade antiviral, e devem ser amplamente investigados.

Os extratos de algas identificados com potencial anti-DENV podem representar fontes para o desenho de compostos com atividade antiviral, em especial para a inibição da entrada do vírus na célula. As perspectivas para a continuidade do trabalho são o fracionamento, purificação e identificação das substâncias responsáveis pela atividade antiviral e tentativa da síntese química dos mesmos e de seus derivados. Uma vez isolados e caracterizados poderão ser testados em modelo *ex vivo* e *in vivo* de infecção pelo DENV. Seguindo com esta abordagem de produtos naturais, realizar a triagem antiviral de extratos de esponjas, que em dados preliminares apresentaram resultados muito promissores.

Resultados animadores também foram obtidos com uma série de antraquinonas sintetizadas quimicamente e que poderiam representar uma classe útil como protótipo para o desenho de moléculas com atividade anti-dengue e/ou imunomodulatória. Como perspectivas estão a triagem antiviral das 49 substâncias sintéticas com DENV sorotipos -2, -3 e -4; e a triagem de outras 58 novas substâncias também aguardam realização. Além disso, a análise de possível atividade imunomoduladora das substâncias com maior efeito antiviral, através de estudos em modelos *ex vivo* e *in vivo*. Além de estudos de modo de ação, com ensaios de tempo de adição, e avaliação da inibição de etapas iniciais da infecção como adsorção e internalização, ou etapas tardias utilizando ensaios de *replicon*.

REFERÊNCIAS

- ALEN, M. M. F. *et al.* Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. **Plos One**, v. 6, n. 6, p. e21658, 2011.
- ALHOOT, M. A. *et al.* Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 719–29, 2013.
- ALIYA, R.; SHAMEEL, M. Marine natural products of *Caulerpa* (Siphonocladophyceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 35, n. 5, p. 659–69, 2003.
- ALVES, C. C. S. *et al.* Anthraquinone derivative O,O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 127–32, 2012.
- BERKOWITZ, F. E.; LEVIN, M. J. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay performed directly on fixed infected cell monolayers for evaluating drugs against varicella-zoster virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 207–210, 1985.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013.
- BORENFREUND, E.; BABICH, H. Comparison of two in vitro cytotoxicity assays- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in vitro**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 1988.
- BYRD, C. M. *et al.* A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 15–25, 2013a.
- BYRD, C. M. *et al.* Novel benzoxazole inhibitor of dengue virus replication that targets the NS3 helicase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1902–12, 2013b.
- CAROD-ARTAL, F. J. *et al.* Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 9, p. 906–919, 2013.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649–88, 1990.
- CHE, P.; WANG, L.; LI, Q. The development, optimization and validation of an assay for high throughput antiviral drug screening against Dengue virus. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 4, p. 363–73, 2009.

CHEN, Y.-L. *et al.* Inhibition of dengue virus RNA synthesis by an adenosine nucleoside. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2932–9, 2010a.

CHEN, Y.-L. *et al.* Inhibition of dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3255–61, 2010b.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in vitro**, v. 12, n. 3, p. 251–8, 1998.

CLEEF, K. W. R. VAN *et al.* Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication. **Antiviral Research**, v. 99, n. 2, p. 165–171, 2013.

CLERCQ, E. DE. Antiviral drug discovery: ten more compounds, and ten more stories (partb). **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 4, p. 571– 610, 2009.

COSTIN, J. M. *et al.* Structural optimization and de novo design of dengue virus entry inhibitory peptides. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e721, 2010.

CRANCE, J. M. *et al.* Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 58, n. 1, p. 73–9, 2003.

CRUZ, D. J. M. *et al.* High content screening of a kinase-focused library reveals compounds broadly-active against dengue viruses. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2073, 2013.

DE BURGHGRAEVE, T. *et al.* An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry *in vitro*. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e37244, jan. 2012.

DENG, J. *et al.* Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2b-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6278–6293, 2012.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, p. 209–19, 1993.

DICK, O. B. *et al.* The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–93, 2012.

FERREIRA, L. D. S. *et al.* Apolar compounds in seaweeds from fernando de noronha archipelago (northeastern coast of Brazil). **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 431954, 2012.

FREARSON, J. A; COLLIE, I. T. HTS and hit finding in academia--from chemical genomics to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1150–8, 2009.

FU, Y. *et al.* Development of a FACS-based assay for evaluating antiviral potency of compound in dengue infected peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Virological Methods**, p. 1–7, 18 2013.

FUJII, M. T. *et al.* Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the Laurencia complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 268–282, 2011.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–96, 1998.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology**, v. 2, n. 1, 2005.

GUILARDE, A. O. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 6, p. 817–24, 2008.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201–17, 1977.

HARDEN, E. A. *et al.* Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 83, n. 3, p. 282–9, 2009.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–96, out. 1990.

HIDARI, K. I. P. J. *et al.* Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 1, p. 91–5, 2008.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 350–4, 2011.

HROBOWSKI, Y. M.; GARRY, R. F.; MICHAEL, S. F. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. **Virology Journal**, v. 2, p. 49, 2005.

IDREES, S.; ASHFAQ, U. A.; KHALIQ, S. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 232–6, 2013.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Cell fixatives for immunostaining. In: JAMUR, M. C.; OLIVER, C. (Eds.). **Immunocytochemical Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2010. p. 55–61.

KAMPMANN, T. *et al.* In silico screening of small molecule libraries using the dengue virus envelope E protein has identified compounds with antiviral activity against multiple flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 84, n. 3, p. 234–41, 2009.

KAPTEIN, S. J. F. *et al.* A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5269–80, 2010.

KHANA VI, M. *et al.* Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. **Biological Research**, v. 43, p. 31–37, 2010.

KIM, E. *et al.* Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterology**, v. 10, p. 96–, 2010.

KOU, Z. *et al.* Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (dv) infection among human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 134–146, 2008.

LAI, C.-J.; PUTNAK, R. Dengue and the dengue viruses. In: TABOR, E. (Ed.). **Emerging Viruses in Human Populations**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 269– 286.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–51, 1992.

LEE, E. *et al.* Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. **Antiviral Research**, v. 69, n. 1, p. 31–8, 2006.

LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738, 1999.

LESCAR, J. *et al.* Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Research**, v. 80, n. 2, p. 94–101, 2008.

LIM, S. P. *et al.* Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. **Antiviral Research**, v. 100, n. 2, p. 500–519, 2013.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae : the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott- Raven, 2007. p. 1101– 1152.

LJUNGDAHLSTAHLE, E. *et al.* Solid phase ELISA for determination of the virus dose dependant sensitivity of human cytomegalovirus to antiviral drugs *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 40, n. 1-2, p. 105–112, 1998.

MALAVIGE, G. N. *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 948, p. 588–601, 2004.

- MANGADA, M. N.; IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, v. 244, p. 458–66, 1998.
- MAROVICH, M. *et al.* Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **The Journal of Investigative Dermatology. Symposium proceedings**, v. 6, n. 3, p. 219–24, 2001.
- MARQUES, C. T. *et al.* Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 115–122, 2012.
- MASTRANGELO, E. *et al.* Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1884–94, 2012.
- MESSINA, J. P. *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, p. 1–9, 2014.
- MILLER, J. L. *et al.* Liposome-mediated delivery of iminosugars enhances efficacy against dengue virus in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6379–86, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 1 jan. 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 4 edição ed. Brasília: [s.n.]. p. 80, 2013.
- MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313–9, 2004.
- MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–7, 2003.
- MORA, C. *et al.* How many species are there on earth and in the ocean? **Plos Biology**, v. 9, n. 8, p. e1001127, 2011.
- MOREIRA, L. A *et al.* A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–78, 2009.
- MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate immunity evasion by Dengue virus. **Viruses**, v. 4, n. 3, p. 397–413, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

- MURRELL, S.; WU, S.-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 239–47, 2011.
- MYC, A.; ANDERSON, M. J.; BAKER, J. Optimization of *in situ* cellular ELISA performed on influenza A virus-infected monolayers for screening of antiviral agents. **Journal of Virological Methods**, v. 77, n. 2, p. 165–77, 1999.
- NAM, V. S. *et al.* Community-based control of *Aedes aegypti* by using *Mesocyclops* in southern Vietnam. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 850–9, 2012.
- NGUYEN, N. M. *et al.* A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 9, p. 1442–50, 2013.
- NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology Journal**, v. 6, p. 211, 2009.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858–1864, 2012.
- OLIVEIRA, A. S. DE *et al.* Chemical composition of diterpenes from the brown alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). **Natural Product Communications**, v. 3, n. 9, p. 1469–1472, 2008.
- OMS. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. New edition ed. France: [s.n.]. p. 148, 2009.
- PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 11–22, 2008.
- POH, M. K. *et al.* A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. **Antiviral Research**, v. 84, n. 3, p. 260–6, 2009.
- QING, M. *et al.* A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery. **Antiviral research**, v. 86, n. 2, p. 163–71, maio 2010.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–31, 2008.
- RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of Dengue Type 2 Viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244–251, 1997.
- ROY, A. *et al.* Profile of hepatic involvement by dengue virus in dengue infected children. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 8, p. 480–5, 2013.
- SAYCE, A. C.; MILLER, J. L.; ZITZMANN, N. Targeting a host process as an antiviral approach against dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 323–30, 2010.

SCHMIDT, A. G. *et al.* Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002627, 2012.

SCHUL, W. *et al.* A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 5, p. 665–74, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Mapa da Dengue no Brasil**, 2013.

SHEPARD, D. S. *et al.* Economic impact of dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

SHUM, D. *et al.* High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 8, n. 5, p. 553–70, 2010.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483–501, 2011.

TALARICO, L. B. *et al.* The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2-3, p. 103–10, 2005.

TEMPORÃO, J. G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 938–939, 2011.

TOMLINSON, S. M. *et al.* Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. **Antiviral Research**, v. 82, p. 110–114, 2009.

TOMLINSON, S. M.; WATOWICH, S. J. Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease. **Antiviral Research**, v. 89, n. 2, p. 127–35, 2011.

TRICOU, V. *et al.* A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e785, 2010.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2–9, 2000.

VERHEIJ, H. J. Leadlikeness and structural diversity of synthetic screening libraries. **Molecular Diversity**, v. 10, n. 3, p. 377–88, 2006.

WANG, Q.-Y. *et al.* A small-molecule dengue virus entry inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1823–31, 2009.

- WANG, W.-K. *et al.* High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Virology**, v. 305, n. 2, p. 330–338, 2003.
- WANG, W.-K. *et al.* Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases** : An official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 43, n. 8, p. 1023–30, 2006.
- WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789–801, 2004.
- WHITBY, K. *et al.* Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 8698–8706, 2005.
- WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518–28, 2007.
- WILDER-SMITH, A. *et al.* Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 157–64, 2010.
- WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **The Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1377–90, 2008.
- WILLIAMS, K. L. *et al.* Therapeutic efficacy of antibodies lacking fccr against lethal dengue virus infection is due to neutralizing potency and blocking of enhancing antibodies. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003157, 2013.
- WISE DE VALDEZ, M. R. *et al.* Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 4772–5, 2011.
- WONG, K. L. *et al.* Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e36435, 2012.
- WU, S. J. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816–20, 2000.
- XIE, X. *et al.* Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. **Journal of Virology**, v. 85, n. 21, p. 11183–95, 2011.
- YANG, C.-C. *et al.* Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 229–38, 2011.
- YANG, J.-M. *et al.* Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as flavivirus inhibitors. **Plos One**, v. 2, n. 5, p. e428, 2007.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, v. 86, n. 3, p. 231–40, 2010.

YIN, Z. *et al.* An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20435–9, 2009.

ZHANG, J.-H. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1999.

ZHANG, X. G. *et al.* Antiviral activity of geneticin against dengue virus. **Antiviral Research**, v. 83, n. 1, p. 21–27, 2009.

ZHOU, Z. *et al.* Antiviral compounds discovered by virtual screening of small-molecule libraries against dengue virus E protein. **ACS Chemical Biology**, v. 3, n. 12, p. 765–775, 2009.

APÊNDICE

Apêndice I – Artigo “ <i>High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses</i> ”	96
Apêndice II – Avaliação da citotoxicidade dos extratos de algas em Huh7.5 com os ensaios de MTT e VN	109
Apêndice III – Avaliação da citotoxicidade das substâncias químicas sintéticas em Huh7.5 com os ensaios de MTT e VN.....	111
Apêndice IV – Artigo “ <i>Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an In Situ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ”	118

Apêndice I. Artigo “High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses”.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses

Deu John M. Cruz^{1*}, Andrea Cristine Koishi^{2,3*}, Juliana Bosso Taniguchi^{4*}, Xiaolan Li⁵, Rafaela Milan Bonotto⁶, Joo Hwan No¹, Keum Hyun Kim⁷, Sungmin Baek⁷, Hee Young Kim⁷, Marc Peter Windisch⁷, Ana Luiza Pamplona Mosimann², Luana de Borba², Michel Liuzzi⁸, Michael Adsetts Edberg Hansen⁵, Claudia Nunes Duarte dos Santos², Lucio Holanda Freitas-Junior^{1*}

1 Center for Neglected Diseases Drug Discovery (CND3), Institut Pasteur Korea, Seongnam-si, Gyeonggi-do, South Korea, **2** Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz Paraná (ICC/FIOCRUZ-PR), Curitiba, Paraná, Brazil, **3** Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil, **4** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, Brazil, **5** Image Mining Group (IMG), Institut Pasteur Korea, Seongnam-si, Gyeonggi-do, South Korea, **6** Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil, **7** Applied Molecular Virology (AMV), Institut Pasteur Korea, Seongnam-si, Gyeonggi-do, South Korea, **8** Early Discovery Program, Institut Pasteur Korea, Seongnam-si, Gyeonggi-do, South Korea

Abstract

Dengue virus is a mosquito-borne flavivirus that has a large impact in global health. It is considered as one of the medically important arboviruses, and developing a preventive or therapeutic solution remains a top priority in the medical and scientific community. Drug discovery programs for potential dengue antivirals have increased dramatically over the last decade, largely in part to the introduction of high-throughput assays. In this study, we have developed an image-based dengue high-throughput/high-content assay (HT/HCA) using an innovative computer vision approach to screen a kinase-focused library for anti-dengue compounds. Using this dengue HT/HCA, we identified a group of compounds with a 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine as a common core structure that inhibits dengue viral infection in a human liver-derived cell line (Huh-7.5 cells). Compounds CND1201, CND1203 and CND1243 exhibited strong antiviral activities against all four dengue serotypes. Plaque reduction and time-of-addition assays suggests that these compounds interfere with the late stage of viral infection cycle. These findings demonstrate that our image-based dengue HT/HCA is a reliable tool that can be used to screen various chemical libraries for potential dengue antiviral candidates.

Citation: Cruz DJM, Koishi AC, Taniguchi JB, Li X, Milan Bonotto R, et al. (2013) High Content Screening of a Kinase-Focused Library Reveals Compounds Broadly-Active against Dengue Viruses. PLoS Negl Trop Dis 7(2): e2073. doi:10.1371/journal.pntd.0002073

Editor: Scott F. Michael, Florida Gulf Coast University, United States of America

Received: June 21, 2012; **Accepted:** January 8, 2013; **Published:** February 21, 2013

Copyright: © 2013 Cruz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: A.C. Koishi and C.N. Duarte dos Santos are supported by fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No. 2012-00011), Gyeonggi-do and KISTI. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: freitasjunior@ip-korea.org

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dengue virus (DENV) is an important mosquito-borne pathogen responsible for causing dengue fever (DF) and the more severe, life-threatening dengue hemorrhagic fever/shock syndrome (DHF/DSS) [1]. DENV is a small, enveloped virus belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. [2]. Dengue virions are approximately 50 nm in diameter [3], containing a single-stranded positive RNA of ~11 kilobase with a genomic organization: 5'-CpreM-E-NS1-NS2A/B-NS3-NS4A/B-NS5-3', and flanked by the 5' and 3' UTRs (untranslated regions) [4,5]. There are 4 serotypes of dengue (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4), with two or more serotypes commonly found to co-circulate in many dengue endemic areas [6,7]. The presence of more than 1 dengue serotype in a geographical area contribute to the persistence of epidemics, as immunity acquired against one dengue serotype does not confer long-term protective immunity against heterologous serotypes [8].

Conversely, individuals that have acquired humoral immunity against one dengue serotype may be pre-disposed to DHF/DSS when subsequently infected with a heterologous serotype through antibody-dependent enhancement [9,10]. Since its re-emergence in 1953, DENV has spread rapidly across 5 continents and more than 100 countries, mostly in tropical and subtropical regions. Present estimates by the World Health Organization place nearly 2.5 billion people at risk of dengue, with approximately 50 million cases of dengue infection and 20 thousand mortalities occurring annually [11].

Due to the global burden of dengue, numerous studies have been done to elucidate the nature of dengue infection and the underlying mechanisms of DF and DHF/DSS. Although ADE is the most widely accepted theory for the occurrence of DHF/DSS, several studies have suggested higher viremia titers, virus serotype and host genetic background as determinants of DHF/DSS [12,13]. Extensive genetic, cellular and immunological studies

Author Summary

Dengue, a re-emergent human disease that places nearly half of the world's population at risk, threatens to further expand in geographical distribution. The lack of an available effective dengue vaccine has encouraged the search for antiviral drugs as an alternative approach. In recent years, drug discovery through high-throughput screening has become a trend in the search for dengue antivirals. In this study, we developed an image-based dengue high-throughput/high-content assay using prevalent viral strains of three dengue serotypes (DENV1, DENV2 and DENV3) isolated from dengue outbreaks in South America and a laboratory-adapted strain of DENV4. We demonstrated the usefulness of our image-based dengue HT/HCA in identifying potential dengue antivirals by screening a small subset of chemical compounds for inhibition of dengue virus infection in a human-derived host cell line (Huh-7.5), and partially characterized their activities against dengue infection in a mosquito host cell line (C6/36), a distantly-related virus (hepatitis C virus), and an unrelated virus that is transmitted by the same mosquito vector (chikungunya virus).

have investigated the role of host innate immunity in the events leading to DHF/DSS [14–16]. However, a clear understanding on the immunopathology of dengue infections remains elusive.

With the number of DHF/DSS cases rising every year, the demand for a preventive, prophylactic, or therapeutic measure against DENV is growing rapidly. Significant progress has been achieved in the development of a dengue vaccine, including one vaccine candidate (ChimeriVax) that has passed through Phase II clinical trials [17]. However, its long-term efficacy and safety has not been established and mass production of this vaccine candidate to meet the growing demand remains a daunting task. A new approach that is gradually gaining interest is the development of dengue antivirals. For the last 6 years, several drug candidates for HCV and other RNA viruses have been pursued for repositioning as potential drug candidates for dengue [18]. Though at present, none of these compounds have gone beyond pre-clinical trials.

Recent advancements in high-throughput screening (HTS) technologies have contributed to increasing efficiency in the drug discovery process. These include *in silico* HTS, *in vitro* enzymatic assays, cell-based reporter assays, image-based whole infection assays, among others [19]. In the work reported here, we describe the development of an image-based high-throughput/high-content assay (HT/HCA) screening method for anti-dengue compounds using an infectious virus system and an innovative approach in image analysis. Using this dengue HT/HCA system, we screened a BioFocus kinase inhibitor library of 4,000 small molecules against DENV1-4 to identify compounds that possess antiviral activity against all 4 serotypes during infection of a human host cell. We counter-screened the primary hits against DENV infection in *Aedes albopictus* clone C6/36, hepatitis C virus (Family *Flaviviridae*, genus *Hepacivirus*) infection, and chikungunya virus (Family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*) infection to partially characterize the compounds as having a host-specific or virus-specific target. The dengue hit compounds were clustered based on their chemical structures and, together with the activity profile, used to identify scaffolds whose antiviral activity against the 4 serotypes vary depending on the chemical substituents. These scaffolds identified from our dengue HT/HCA screening could be used as potential starting points for the development of dengue antivirals.

Methods

Cells and Viruses and Antibodies

The mosquito cell line C6/36 *Aedes albopictus* clone (CRL-1660), mouse hybridoma cells D1-4G2-4-15 (HB-112), and human hepatocyte Huh-7.5 (PTA-8561, U.S. Patent Number 7455969) were obtained from the American Type Culture Collection. HuH-7 (JCRB0403) was kindly provided by Dr. Katja Fink. Three South American isolates of dengue viruses: Den1 BR/90 (GenBank AF226685.2), BR DEN2 01-01 (GenBank JX073928), BR DEN3 290-02 (GenBank EF629369.1), and the World Health Organization laboratory strain DEN4 TVP-360 were generously provided by Dr. Claudia N. Duarte dos Santos. Hepatitis C virus (HCV) genotype 2a (JFH-1) expressing the NS5a-GFP fusion protein was kindly provided by Dr. Marc Windisch and the chikungunya virus (CHIKV-118-GFP) was a generous gift from Dr. Olivier Schwartz. C6/36 was maintained at 28°C in Leibovitz's L-15 media (Gibco/Invitrogen, USA) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco/Invitrogen, USA), 0.26% Tryptose Phosphate Broth (TPB, Sigma-Aldrich, USA) and 25 µg/mL Gentamicin Sulfate (Gibco/Invitrogen, USA) and passaged every 3–4 days. Huh-7.5 was maintained under humidified conditions at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco's minimum essential medium/Hank's F-12 (DMEM/F12, 1:1) (Gibco/Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS and 100 U/mL Penicillin/100 µg/mL Streptomycin (antibiotic solution, Gibco/Invitrogen, USA) and passaged every 3–4 days. HuH-7 was cultured under humidified conditions at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640 containing 25 mM HEPES (WelGene, South Korea) supplemented with 10% FBS and antibiotic solution. Low passaged dengue viruses were propagated for 7 days in C6/36 maintained at 28°C in Virus Medium (VM: Leibovitz's L-15 medium supplemented with 1% FBS, 0.26% TPB, 25 µg/mL Gentamicin) according to previously described methods [20] and titrated by focus formation assay (FFA) using C6/36 as previously described [21]. Dengue virus titers were expressed as focus forming units per mL (ffu/mL). Flavivirus group-specific α E monoclonal antibody 4G2 [22], used as detecting antibody, was prepared from culture supernatant of D1-4G2-4-15 maintained under humidified conditions at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640 containing 25 mM HEPES (WelGene, South Korea) and supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, USA), antibiotic solution and 250 ng/mL Amphotericin B (Sigma-Aldrich, USA). 4G2 was concentrated by ammonium sulfate precipitation following previously described methods [23] and purified by protein G affinity chromatography (GE Amersham, Sweden) according to manufacturer's instruction. Total antibody protein was determined by spectrophotometric analysis using the formula of Warburg and Christian [24].

Compound Library and Reference Compounds

A small target-focused chemical library, comprising of 4,000 synthesized compounds based on ligand binding of known kinase binding sites, was sourced from BioFocus (Galapagos, Belgium). Reference compounds were purchased from TOCRIS Bioscience (Bristol, UK): AZ 10417808, BIBU 1361, LE 135 and MPP and Sigma-Aldrich (USA): Chloroquine, ribavirin and recombinant human Interferon- α A (IFN- α 2A). All compounds from the BioFocus kinase inhibitor library and reference compounds were prepared in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), with the exception of IFN α A that was prepared in Dulbecco's Phosphate-buffered saline (DPBS, WelGene, South Korea) containing 5% FBS.

Liquid Handling and Automation

For dispensing of liquid media containing the host cell and viruses, the Thermo Scientific WellMate (Fischer Brand, USA) was used. Dispensing of antibody solutions and other liquid reagents for IFA, including the washing steps, was done using the 96/384-head BioTek EL406 automated liquid washer/dispenser (BioTek, USA).

Assay Miniaturization and Optimization

For miniaturization of the image-based dengue HT/HCA, the following conditions were optimized: a) host cell seeding density, b) multiplicity of infection (M.O.I.) and c) incubation period of infection. For the optimum host cell density, Huh-7.5 cells were prepared at various cell densities and seeded in a 384-well plate, μ -clear black (Greiner Bio-one, Germany). The cells were cultured between 2–4 days at 37°C, 5% CO₂. For dengue virus infection, the optimum cell seeding density of Huh-7.5 was inoculated with DENV1, DENV2, DENV3 or DENV4 at various M.O.I. (0.1–5) and cultured between 2–4 days at 37°C, 5% CO₂.

Immunofluorescence Detection of Dengue-infected Cells

An immunofluorescence assay (IFA) used to detect dengue infection was optimized for the dengue HT/HCA. Briefly, cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature (Rm T). PFA-fixed cells were treated with 0.25% (v/v) Triton-X for 20 min at Rm T. DENV-infected cells were detected by probing with 4G2 mAb prepared in blocking buffer: DPBS containing 5% FBS for 30 min at 37°C, followed by AlexaFluor-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen Molecular Probes, USA) prepared in blocking buffer for 30 min at 37°C. Cell nuclei counterstained with 5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, USA). Two washing cycles of DPBS was done after each step of the IFA. After the final washing, digital images were acquired using a high-throughput confocal fluorescence imaging system (Evotec Technologies High-Throughput Cell Analyzer Opera, Perkin Elmer, USA). The digital images were taken from 3 different fields of each well at 20 \times magnification.

Image Analysis Software Development

Acquired images were analyzed using our in-house developed image-mining platform (IM). This platform is designed to do high-content screening and directly access the database of images that were sequentially analyzed with specially designed algorithms developed as a customized plug-in to the IM platform. The results of all the analyses were stored in a centralized database. The IM plug-in for dengue HT/HCA works by independently analyzing two separate channels acquired with the Evotec Technologies High-Throughput Cell Analyzer Opera using different algorithms and converging these results to yield the final readout. One channel (DAPI-channel) captures the signal emitted by DAPI-stained nuclei at 450 nm, while the other channel (A488-channel) captures the signal emitted by the AlexaFluor 488 dye bound to the dengue E protein-antibody complexes confined in the cytoplasm of dengue-infected cells at 540 nm. To define the percentage of dengue-infected cells and, conversely the non-infected cells, a modified watershed method was applied. Compared to the original watershed algorithm [25] that uses the morphological gradient image, a weighted gradient image is used for the topographic surface, whose weights are defined as the ridge values computed from the eigen values of the original image. The percentage of non-infected cells, which is also defined as the percent inhibition or percent activity, is derived by using the formula: $[1 - (\text{A488-positive cells}/\text{total cells})] \times 100\%$.

Assay Validation with Reference Compounds

The dengue HT/HCA was validated by 1) by infecting Huh-7.5 cells in 384-well plates spotted with 0.5% DMSO with DENV or MOCK plated and 2) observing the dose-response curves of reference compounds previously reported to have anti-dengue activity. In both validation experiments, Huh-7.5 was mixed with DENV1, DENV2, DENV3 or DENV4 at a M.O.I. of 0.5 or VM only for MOCK-infection and dispensed in designated wells using the Thermo Scientific WellMate automated liquid dispenser. For the first validation experiment, the statistical reliability of the dengue HT/HCA was determined by calculating the Z'-factor for the percent infection or percent inhibition. Briefly, the Z'-factor of a defined parameter is calculated using the formula: $1 - [(3\sigma_p + 3\sigma_n)/(|\mu_p - \mu_n|)]$, where the μ_p , μ_n , σ_p and σ_n are the means (μ) and standard deviations (σ) of the positive (p) and negative (n) controls [26]. For the second validation experiment, the reference compounds were prepared in 2-fold serial dilutions and dispensed in duplicate wells in the 384-well plate, followed by the Huh-7.5 and DENV mixture (M.O.I. 0.5). Percent infection, percent inhibition, and percent cell number were determined using the customized IM platform plug-in. Scatter-plot distribution was generated using TIBCO Spotfire 4.5.0 (TIBCO Software Inc., Somerville, MA). The ten-point dose-response curves (10-pt DRCs) were plotted using the non-linear regression formula: log (inhibitor) vs. response – variable slope (4 parameters), available in GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The top and bottom values of the reference compounds were unconstrained when the curve fittings of the 10-pt. DRCs were generated.

Primary Screening of the BioFocus Kinase Inhibitor Library

The BioFocus kinase inhibitor library were screened against DENV1, DEN2, DENV3 and DENV4 at 10 μ M in 0.5% (v/v) DMSO. MOCK-infected Huh-7.5 and IFN- α 2A (500 U/mL) were used as positive controls, and the 0.5% DMSO vehicle was used as negative control. Four sets of 15 384-well plates (13 plates designated for test compounds and 2 plates designated for DMSO vehicle control) were used for the primary screening of the BioFocus kinase inhibitor library against each dengue serotype. Each of the 4,000 compounds in the library was tested in single wells. For data normalization and quality control of the screening, each test compound plate contained 16 replicates of the positive and negative controls. After dispensing the test compounds IFN- α 2A and DMSO vehicle in the 384-well plates, Huh-7.5 was mixed with DENV1, DENV2, DENV3, or DENV4 to achieve a M.O.I. of 0.5 and dispensed at 5×10^3 cells/well using the Thermo Scientific WellMate automated liquid dispenser. For the MOCK-infected Huh-7.5, the cells were mixed with VM and dispensed under the same conditions as previously stated. Virus infection in the presence of the compounds proceeded at 37°C, 5% CO₂ for 96 hrs. Compound activity based on percent inhibition and cell toxicity was assessed by IFA and IM analysis as described above. Scatter-plot distribution of the entire screening was generated using TIBCO Spotfire 4.5.0 (TIBCO Software Inc., Somerville, MA).

Data Normalization and Assay Quality Control

The calculated activity was normalized to a percent inhibition (PI) based on the MOCK-infected cells (100% activity, or zero infection) and dengue-infected cells (0% activity, or maximum measured infection percentage) controls according to the formula:

% activity =

$$\frac{(\mu\text{PI}_{\text{measured}} - \mu\text{PI}_{\text{DENV-infected}})}{(\mu\text{PI}_{\text{MOCK-infected}} - \mu\text{PI}_{\text{DENV-infected}})} \times 100\%$$

where: $\text{PI}_{\text{measured}}$ - percent inhibition of test compound

$\mu\text{PI}_{\text{DENV-infected}}$ - average percent inhibition readout of dengue-infected control

$\mu\text{PI}_{\text{MOCK-infected}}$ - average percent inhibition readout of non-infected control

Similarly, the percent cell number was normalized based on the measured cell number in MOCK-infected (100% cell number) controls according to the formula: % cell number = $(C_{\text{measured}} / \mu C_{\text{MOCK-infected}}) \times 100\%$, where C_{measured} is the measured cell number in the test well and $\mu C_{\text{MOCK-infected}}$ is the average cell number in the MOCK-infected controls. The statistical validity of the dengue high-throughput screening was determined by calculating for the Z'-factor using the 0.5% DMSO-treatment and MOCK-infected Huh-7.5 as negative and positive controls, respectively. In addition, other parameters, including DRC of a reference compound, were used to evaluate the assay performance. For the primary screening a Z'-factor ≥ 0.5 and a coefficient of variation (CV) among the controls $\leq 10\%$ was used to validate the results of the assay. The hit (i.e. a compound that demonstrates inhibition of infection) selection criteria for the primary screening was set at $\geq 80\%$ inhibition of dengue viral infection in at least 1 dengue serotype and with the corresponding percent cell number at $\geq 50\%$.

Counter-screening against Dengue Infection in C6/36

The hits identified from the primary screening were tested at 10 μM for inhibition of dengue virus infection in C6/36. Briefly, cells were inoculated with DENV1-4 at an M.O.I. of 0.5 and seeded in 384-well plates spotted with the reference and primary hit compounds and incubated for 96 hrs at 28°C. Detection of dengue-infected cells by IFA and image acquisition using Evotec Technologies High-Throughput Cell Analyzer Opera was carried out following the method described above. Compound activity was determined by measuring percent inhibition and percent cell toxicity using the IM platform as previously described.

Counter-screening against HCVcc

The hits identified from the primary screening were tested at 10 μM against HCV genotype 2a (JFH-1) infection in Huh-7.5 using an *in vitro* HCV cell culture system (HCVcc). Cells were seeded in 384-well plates and cultured under humidified conditions at 37°C for 24 hrs. Reference and primary hit compounds were added, followed by inoculation with HCV at an M.O.I. of 1 and incubated for another 72 hrs at 37°C. HCV-infected cells were identified by detection of NS5A-GFP expression using ImageXpress Ultra (Molecular Devices, USA) and analysis using the IM platform as previously described. Compounds resulting in $\geq 50\%$ inhibition of HCV genotype 2a infection and percent cell number $\geq 50\%$ were considered as positive hits for anti-HCV activity.

Counter-screening against Chikungunya Virus

The hits identified from the primary screening were also tested at 10 μM against CHIKV-118-GFP infection in HuH-7 cells and evaluated by resazurin reduction assay (RRA). Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) is reduced to the red

fluorescent resorufin by redox enzymes produced by viable cells, and is a good indication of metabolic capacity, and by extension cell viability. The amount of converted resorufin was measured as relative fluorescence readout (RFU) at excitation/emission of 531/572 nm using a fluorescence spectrophotometer (Victor³ V Spectrophotometer, Perkin Elmer, USA). Briefly, cells were inoculated with CHIKV-118-GFP at an M.O.I. of 0.5 and seeded in 384-well plates containing reference and primary hit compounds and incubated under humidified conditions for 72 hrs at 37°C. Resazurin solution was added to a final concentration of 10 μM and further incubated for another 12 hrs prior to measurement of RFU. The percent activity of the compounds, reflected by the percent cell viability, was quantified by normalizing against the RFUs of MOCK-infected cells and CHIKV-118-GFP-infected cells. Compounds resulting in normalized RFU $\geq 70\%$ were considered as positive hits for anti-CHIKV activity.

Hit Confirmation by Dose-response Curves

To confirm the compound activity against dengue viruses, the selected hits from the primary screening were tested in a 10-pt. DRC (2-fold serial dilution from 50 μM) using the same assay described for the dengue HT/HCA. Each concentration of the hit compounds was tested in duplicate wells. Data generated from image analysis of the 10-pt. DRC was plotted and analyzed using the non-linear regression formula: log (inhibitor) vs. response – variable response (4 parameters) in GraphPad Prism 5.04. The EC_{50} value, defined as the effective concentration resulting in a 50% inhibition of DENV infection, was used to evaluate compound activity. Compound toxicity was determined by testing the hit compounds in a 10-pt. DRC against Huh-7.5 in the absence of viral infection and measuring the cell viability using resazurin reduction assay as described above. The CC_{50} value, defined as the compound concentration resulting in a 50% reduction in cell viability (based on normalized RFU values) compared with the MOCK-infection, was used to evaluate cell toxicity. Confirmed hits were selected based on their *Selectivity Index* (SI), a dimensionless value that indicates the magnitude between cytotoxic concentration and effective concentration, and is calculated as: $\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$.

Structural Analysis of Hit Compounds

Cluster analysis was done using a molecule-clustering module from Pipeline Pilot (Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA). The active scaffolds of compounds confirmed to have anti-dengue activity through dose response curves were selected for structural analysis. Structural relationship among the hit compounds was analyzed using the Tanimoto coefficient structural similarity [27].

Results

High Throughput-High Content Assay Development

Several phases were involved in developing the image-based dengue high-throughput/high-content assay (HT/HCA). A schematic workflow diagram of the assay development and assay method is shown in Figure S1. The first phase involved miniaturization of the assay to the 384-well plate format, including host cell seeding density and viral infection conditions. Selection criteria for the appropriate cell seeding density was included having a sufficiently high number cells but with enough spatial distribution for proper identification and accurate segmentation by the IM platform plug-in. After testing various seeding densities of Huh-7.5, the seeding density of 5×10^3 cells per well was selected (data not shown). DENV infection in Huh-7.5 was visualized by

immunofluorescence assay (IFA) detection of the dengue E protein using the 4G2 mAb and confocal imaging using the Evotec Technologies High-Throughput Cell Analyzer Opera. For the DENV infection, a M.O.I. of 0.5 and incubation time of 96 hrs was used since it allows for multiple rounds of virus replication and facilitates the screening of active compounds that target different stages of the dengue virus life cycle (Figure S2).

Developing the IM Plug-in for Dengue HT/HCA

A flowchart of the image analyses is shown in Figure 1. Defining the cell nuclei was done as follows (Figure 1A–D): after applying a Gaussian low pass filter [28] with relatively high sigma value (to the nucleus size) on the DAPI channel (Figure 1A), the local maxima (Figure 1B) were subsequently located. A k-means clustering method [29] was then utilized to separate the

background and foreground to obtain the nuclei mask image (Figure 1C) and the local maxima located in the background were removed, leaving the remaining maxima as those representing the number of cells in the image. Starting from the local maxima constrained by the nuclei mask, along with the slightly blurred nucleus image as a distance map, the region for single nuclei were defined (Figure 1D) with the watershed method [25].

Identifying the dengue-infected cells and the percentage of non-infected cells were done as follows (Figure 1D–I): from the image obtained from the A488-channel (Figure 1E), a weight map was calculated based on the edge features of this channel (Figure 1F). After applying an open-by-reconstruction operator and Gaussian low-pass filter to alleviate the noise, a foreground mask was attained (Figure 1G). Starting from the separated nuclei borders (Figure 1D) constrained by the foreground mask, and along with

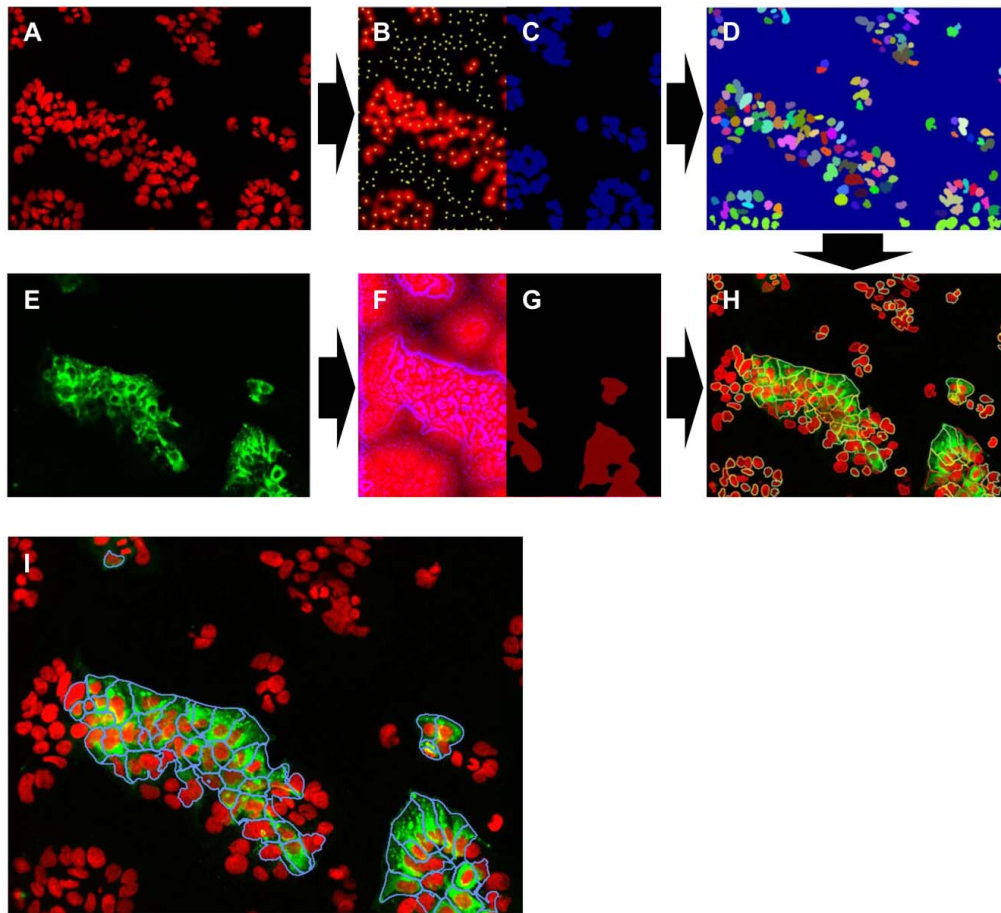


Figure 1. Software development for image-based analysis of dengue virus infection. Acquired confocal images of dengue infection in Huh-7.5 were analyzed using an in-house IM software. The number of cells in the images is determined by detecting the local maxima (B and C) from the DAPI channel (A). The region of a single nucleus (D) is defined using watershed-like method. Afterwards, a weighted distance map (F and G) of Alexa488 signal channel (E) is calculated to direct further watershed from the border of detected nucleus border (D) to define the so-called cell body. Finally, quantitation of dengue-infected cells is done by calculating the number of Alexa488-positive cell cytoplasm (the blue-marked cells in I) divided by the total number of cells (all the colorful-marked cells in H). (All images were taken at 20× magnification, false-color).
doi:10.1371/journal.pntd.0002073.g001

the weight map, the region of the signals were defined and marked with four different colors (Figure 1H), delineating the borders of the cells. Finally, the dengue-infected cells are identified as those having an A488 signal within the defined cell borders above a pre-defined threshold level, and are delineated by blue line segments (Figure 1I).

Assay Validation

The first assay validation evaluated the Z'-factors for DENV1-4 infection of Huh-7.5 in the 384-well plate format. Figure 2A shows a representation of the validation process done for the DENV2 HT/HCA. Cells, virus, and a reference control were dispensed in 384-well following a designed template pattern (upper left panel). After the viral infection period and IFA, IM analyses of the acquired images revealed the infection percentage, cell number based on nuclei detection and other pre-defined parameters. An IM analysis showing the relative percentage of DENV2 infection is represented by a generated heat map (lower left panel). The Z'-factor was calculated using the average and standard deviations of the percent infection of the positive and negative controls (right panel). MOCK-infected Huh-7.5 was designated as positive control while the DENV-infected Huh-7.5 was used as the infection control. All wells contained 0.5% DMSO vehicle to simulate the culture conditions used in the screening. The calculated Z'-factors for the DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4 HT/HCA in 384-well plates showed a range between 0.50 and 0.75 (Figure S3). According to Zhang et al. [26] a Z'-factor ≥ 0.5 indicates a statistically reliable separation between positive and negative controls.

The second assay validation tested a panel of reference compounds previously reported to have antiviral properties against different strains of DENV2. This panel includes: AZ10417808, BIBU1316, MPP, LE 135 [30], Ribavirin [31], Chloroquine [32] and IFN- α 2A [33]. MOCK-infection and 0.5% DMSO were used as positive and negative controls, respectively. The compounds' antiviral activities and cell toxicities against BR DEN2 01-01 infection of Huh-7.5 were determined by DRC. Figures 2B shows the generated heat map for percent DENV2-infected cells and percent cell viability. Figure 2C shows the DRC of the reference panel, with the percent infection normalized against DENV2-infected Huh-7.5 and percent cell viability normalized against MOCK-infected Huh-7.5. It was observed that all compounds in the reference panel showed inhibition of DENV2 infection in a dose-dependent manner. At very low concentration of the reference compounds, the percent cell viability of DENV2-infected cells did not exceed 75% compared with the MOCK-infected cells, as a consequence of DENV2-associated cytopathic effect. The resulting EC₅₀ of the reference compounds against the DENV2 infection of Huh-7.5 using our dengue HT/HCA varied from those previously reported. Furthermore, most of the compounds in our reference panel exhibited significant cell toxicities at EC₅₀ compared with the MOCK-infected and DENV2-infected controls. Conversely, IFN- α 2A concentration \geq EC₅₀ resulted in higher cell numbers compared with MOCK-infected Huh-7.5. Discrepancies between the EC₅₀ of the reference compounds obtained in this study with the previous reports may be attributed to factors such as intrinsic differences between the DENV2 strains and the type of host cell used. Nonetheless, the results of the assay validation demonstrate the statistical reliability of our developed dengue HT/HCA. None of the compounds in the reference compound panel exhibited the ideal EC₅₀ and CC₅₀ values for use in the dengue HT/HCA. While IFN- α 2A has shown strong antiviral properties against dengue infection, having a multi-target mode of action restricts its application as a reference

drug. Based on these observations, MOCK-infection and IFN- α 2A were used as positive controls for the screening of the compound library, but only MOCK-infection was used for calculating Z'-factors and validating the reliability of the entire screening process.

Screening of the BioFocus Kinase Inhibitor Library

The compounds screened with our dengue HT/HCA is a subset of 4,000 small molecules belonging to the BioFocus kinase inhibitor library of chemical compounds designed to interact with one of the seven representative subsets of kinases according to protein conformations and ligand binding modes [34]. The library was screened at 10 μ M against DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4, and primary hits were selected based on the criteria: $\geq 80\%$ activity and $\geq 50\%$ cell number (Figure 3). The 50% cell number threshold was chosen to allow a wider range of compounds that are slightly cytotoxic at 10 μ M, but may still be active at lower concentrations, to be selected. Primary hits were selected for activity against at least 1 dengue serotype. Out of the 4,000 small molecules screened, 157 compounds qualified for further confirmation and counter-screening, giving a hit rate of 3.9%. The primary hits were selected according to activity ($\geq 80\%$ inhibition), irrespective of their cytotoxicity levels. Among the 157 primary hits, 40 compounds (25.5%) showed inhibition of all 4 serotypes, 19 (12.1%) against 3 serotypes, 30 (19.1%) against 2 serotypes, and 68 (43.3%) against 1 serotype.

Profiling the Activity of Dengue Primary Hits

The inhibitory properties of the dengue primary hits were further investigated by testing these compounds at 10 μ M against DENV infection of C6/36, HCV genotype 2a infection of Huh-7.5, and CHIKV-118-GFP infection of HuH-7. The activity profile of these dengue primary hits is summarized in Figure S4. Thirty-nine of the dengue primary hits (24.8%) exhibited $\geq 50\%$ inhibition against at least 1 DENV serotype in the C6/36 host, suggesting that the targets of these compounds are required for successful DENV infection in both human and insect host cells. It is important to note that even though the other 118 dengue primary hits (75.1%) did not inhibit DENV infection in C6/36 at the same concentration, the putative role of their targets in DENV infection in the insect cells have not been ruled out. Conversely, 103 dengue primary hits (65.6%) showed $\geq 50\%$ inhibition of HCV genotype 2a infection of Huh-7.5 at 10 μ M, with only 19 hits exhibiting $< 50\%$ cell number in the host cell. In contrast to the high number of overlapping hits between DENV and HCV genotype 2a, only 9 (5.7%) of the dengue primary hits exhibited detectable activity against CHIKV-118-GFP in the resazurin reduction assay. These hits had low antiviral activity, and were excluded after conducting DRC analysis (data not shown).

Chemical Structures of Anti-Dengue Compounds

The activities of the 157 primary hits were confirmed by 10 pt. DRC against DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4 infection in Huh-7.5. Cluster analysis of the top 53 compounds exhibiting the lowest EC₅₀ values were performed using a molecule-clustering module from Pipeline Pilot yielded 4 enriched clusters plus singletons. Core structures of the two scaffolds were heterocyclic ring of imidazopyridine and the other two scaffolds were thiazole-based compounds. One of the thiazole scaffold clusters, consisting of 11 compounds, had 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine as a common core structure. The profile of these compounds (EC₅₀, CC₅₀ and Selectivity Index) against the four dengue serotypes and their chemical structures are shown in Table 1 and Figure 4, respectively. The compounds showing a wide spectrum of anti-dengue activity against all four serotypes have only pyridine

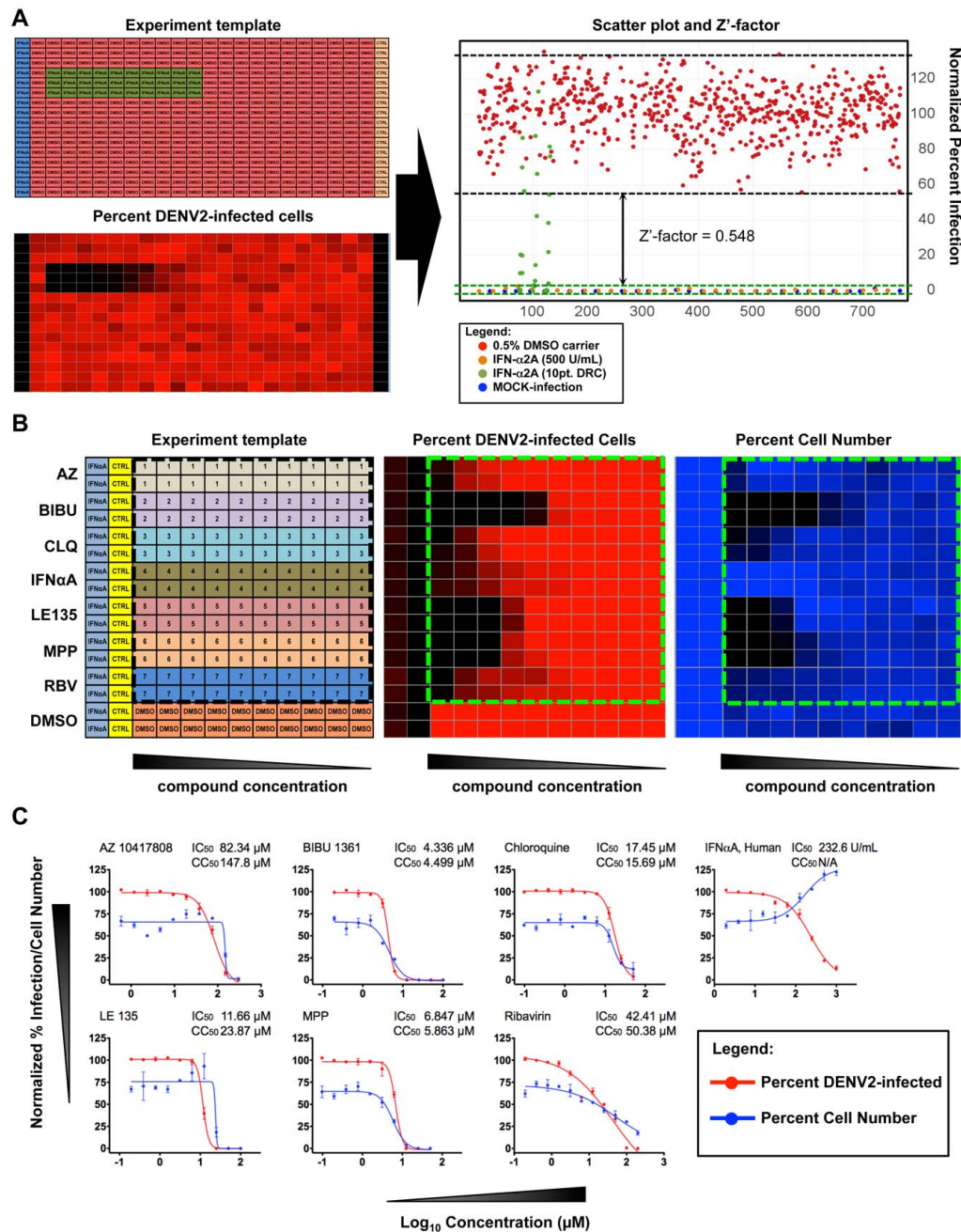


Figure 2. Assay validation of the image-based dengue HT/HCA. The first assay validation determined the degree of separation between positive and negative controls (A). *Upper left panel:* layout of controls in the 384-well plate; *Lower left panel:* generated heat-map representing percentage of Huh-7.5 infected with DENV2; *Right panel:* Scatter plot distribution shows the percentage of DENV2-infected cells under the following treatments: 0.5% DMSO carrier (red), 500 U/mL IFN- α 2A (orange), 10 pt. DRC of IFN- α 2A (green), MOCK-infection (blue). Area under the black and

green dotted lines represents the variability of DENV infection and MOCK infection controls, respectively. The arrows represent the degree of separation (Z' -factor) between the two controls. The second assay validation determined the dose-response curves of a reference compound panel (B). *Left panel:* layout of the reference compounds spotted in designated wells of a 384-well plate; *Middle panel:* heat-map showing relative percentage of DENV2-infected cells; *Right panel:* heat-map showing relative percent cell viability based on average cell number. (C) 10 pt. DRC of the reference compound panel. Percent infection was normalized against DENV2-infected Huh-7.5, and percent cell number was normalized against MOCK-infected Huh-7.5.

doi:10.1371/journal.pntd.0002073.g002

or pyrimidine ring by amine linkage to the core scaffold and addition of substituents on the ring narrows the spectrum of activity, especially against DENV4. In addition, 9 out of 10 compounds in this cluster have an extra carbon next to aminoethyl linkage at 4th position of thiazole, followed by a phenyl group and trifluoro-, methoxy-, amine or chloride substituents on *para* position of the phenyl group.

Discussion

From the time of its re-emergence 60 years ago, dengue has spread across the globe, placing nearly 40% of the world's population at risk of infection. Coincidentally, the geographical distribution of the four serotypes has also expanded, with all

serotypes reported to co-circulate in most of the dengue-endemic countries [7]. This has serious implications in the rise of DHF/DSS cases, as it is presently understood that antibody-dependent enhancement combined with elevated cytokine responses resulting from subsequent infection with a heterologous serotype are involved in disease severity [35]. The most advanced dengue vaccine candidates try to address this issue by constructing chimeric YF/DENV virus (ChimeriVax-DEN), incorporating the prM and E genes of each DENV serotype in the yellow fever (YF) 17D backbone, and used these to prepare tetravalent cocktails [36]. However, while the tetravalent ChimeriVax-DEN vaccine has shown good immunological responses in clinical trials [17], its long-term safety and efficacy has not been fully established. In contrast to the dengue vaccine approach, therapeutic drug

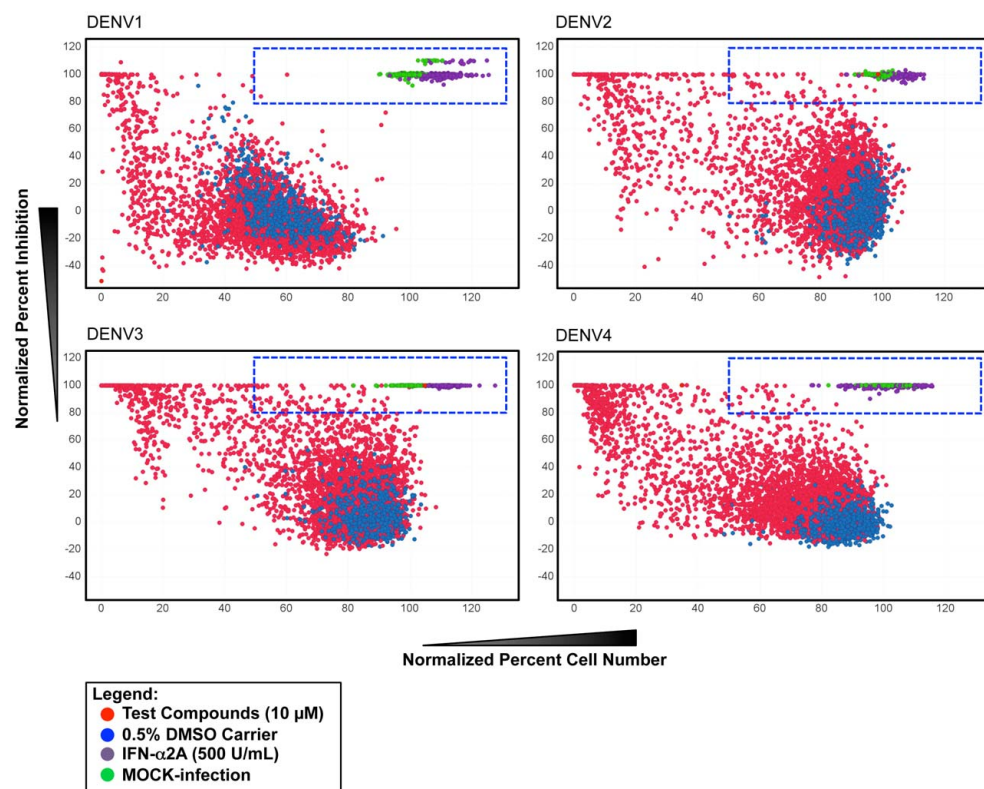


Figure 3. Primary screening of the BioFocus kinase inhibitor library. A collection of 4,000 compounds synthesized on the basis of known kinase binding sites were screened for antiviral activity against DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4 infection in Huh-7.5. Scatter-plot distribution shows compound activity based on percent inhibition and percent cell number resulting from the following treatment: 10 μ M test compounds (red), 0.5% DMSO carrier (blue), MOCK-infection (green), 500 U/mL IFN- α 2A (purple). Area under the dotted squares indicate selected primary hits from each serotype based on the criteria: $\geq 80\%$ inhibition and $< 50\%$ cell number.

Table 1. Serotype specificity and virus selective of the hit compounds in the 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine cluster.

Specificity					EC ₅₀ (μM)/SI				
(Serotype)	Compound				CC ₅₀ (μM)	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1 2 3 4	CND1203				>100	1.7/>59	4.1/>24	2.3/>43	5.0/>20
1 2 3 4	CND1201				>100	0.9/>111	7.6/>13	2.6/>38	5.0/>20
1 2 3 4	CND1243				>100	4.1/>24	6.2/>16	1.0/>100	7.2/>14
1 2 3	CND1081				>100	1.5/>66	2.1/>48	3.1/>32	12/8.3
1 2	CND1043				43	4.1/10	3.1/14	5.7/7.5	6.9/6.2
1 3	CND1244				21	1.7/12	2.9/7.2	1.6/13	4.4/4.8
1	CND0975				44	1.0/44	5.5/8	>50/<1.0	>50/<1.0
2	CND1057				23	3.3/7.0	1.0/23	2.9/7.9	10/2.3
4	CND0968				29	>25/<1.2	6.4/4.6	6.2/4.7	1.1/26
	CND1020				25	3.9/6.4	13/1.9	3.4/7.3	19/<1.3
	CND1172				15	7.3/2.1	10.4/1.4	4.8/3.1	7.5/2.0

SI is determined by the formula: CC₅₀/EC₅₀.
doi:10.1371/journal.pntd.0002073.t001

approach circumvents the immunopathological complication of dengue, and directly addresses the acute viral infection. The work reported here describes the development of a high-throughput/high-content assay screening for potential anti-dengue drugs using image-based quantitation of inhibition of dengue virus infection *in vitro* as a measure of antiviral activity. This dengue HT/HCA was used to screen 4,000 small molecules from the BioFocus kinase inhibitor library against DENV1-4, and revealed a number of compounds that inhibit more than 80% infection of all 4 serotypes of dengue *in vitro*. More than 60% of these compounds were also found to inhibit more than 80% infection of HCV genotype 2a infection. Interestingly, most of the compounds belonging to the 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine cluster exhibited measurable antiviral activities against dengue viruses in Huh-7.5, but did not demonstrate strong inhibition of HCV genotype 2a infection in the same host cells.

Recently, high throughput assays (HTA) have been used to find several drug candidates with anti-dengue properties [37]. Structure-based dengue virtual screening (i.e. *in silico* high-throughput

screening or HTS) is a target-based HTA that analyzes the binding potential of chemical compounds against a target dengue viral protein. Using combinatorial libraries and docking programs that predict the chemical interactions, binding potentials of the compounds with known crystal structures and associated ligands of the target protein are computed. This approach has been used extensively in discovering potential inhibitors of DENV E protein binding and fusion [38,39] NS5 2'-O-Methyltransferase [40], NS3 protease [41,42] and its complex, NS2B/NS3protease (NS2B/NS3pro) [43]. Another target-based HTS approach using enzymatic assay has identified BP2109 as a potential inhibitor of NS2B/NS3pro complex [44]. One drawback of *in silico*-based HTS is that predicted chemical interactions do not take into account other biological factors. This often results in selection of compounds with high binding properties *in silico*, but weak activities once tested *in vitro*. Similarly, target-based enzymatic assays are performed in a highly controlled environment that facilitates optimum enzymatic function of the target, which can be dramatically different from its biological setting. Thus, compounds

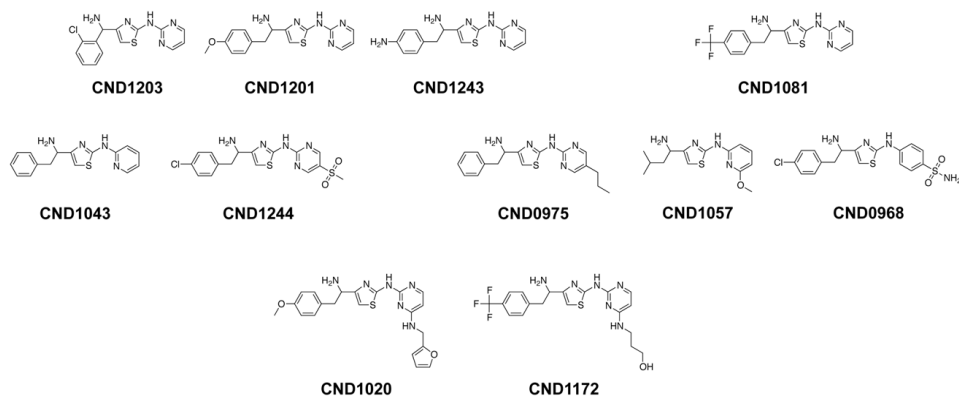


Figure 4. Chemical structures of the 11 compounds having the 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine core scaffold.
doi:10.1371/journal.pntd.0002073.g004

found to be highly active against the target using this approach may not exhibit the same effect when tested using a cell-based assay, since the assays do not factor in cellular uptake, availability of the target, and other environmental conditions [45]. The *in silico* and target-based HTA approaches are designed to find active compounds against a specific target. While this helps to simplify the process of identifying the probable mechanism of action, it is inherent in the assays to exclude compounds that may be active against other targets involved in viral infection. Hence, their application to the comprehensive screening of active compounds against viral infection is limited.

In contrast to target-based HTA, cell-based HTA is more robust as it covers a wider aspect of the viral infection process. This type of HTA uses either infectious viruses to follow one or multiple rounds of viral infection, or viral replicons to observe the events surrounding viral replication. Cell-based dengue HTA takes advantage of the various intracellular and intercellular events that occur during viral infection. Hence, antiviral properties can be attributed to either compound activity against viral or cellular targets. Cell-based flavivirus immunodetection (CFI), which measures viral protein expression after infection by ELISA, and luciferase reporter viral replicon assay were used to identify inhibitors of viral RNA synthesis namely, the adenosine nucleoside inhibitor NITD008 [14], NS4B inhibitor NITD-618 [46] and NITD-982, an inhibitor of host dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) [47]. A modified type of the viral replicon assay using dengue-1 virus-like particles (DENV1-VLP) assembled by packaging the dengue viral replicon tagged with a *Renilla luciferase 2A* reporter gene (*Rluc2A*) in DENV1 structural proteins generated using the Semliki Forest Virus (SFV) expression system was reported to be useful in identifying inhibitors of dengue viral entry, translation and replication [48]. In addition to the expression of viral proteins during infection or replication, other indications of viral infection can be used to assess compound activity such as cell death and reduced metabolic activity. A dengue cytopathic effect (CPE)-based HTA that uses luminescence assay to determine cellular viability by measuring cellular ATP was previously reported [49]. These cell-based HTA are described as “single-readout” assays, since a single value is generated during the assay corresponding to the effect of a particular treatment.

Image-based high-content assay (HCA) is also a form of cell-based assay. Unlike CFI and replicon-based luciferase reporter assays however, it requires more sophisticated equipment like a high-throughput confocal microscope for acquiring images and special software for analyzing image data. When adapting image-based HCA for high-throughput screening, it is more labor intensive and requires more stringent criteria for data analysis. Nonetheless, image-based HCA has one clear advantage over single-readout assays – the amount of information that can be generated from images of a single treatment is not limited to a single value. Aside from the degree of viral infection and cell viability, other interesting information can be extracted from images such as morphological changes in host cell, protein localization, among others [50]. Like other cell-based HTA, image-based assay can be used to screen compounds with diverse modes of activity. This was demonstrated in an image-based HCA screening of 5,362 compounds with diverse chemical structures against DENV2, revealing 73 active compounds, most of which have previously characterized cellular interactions [30]. Dasatinib, a c-Src kinase inhibitor that disrupts the assembly of dengue virions in virus-induced membranous replication complexes, was also identified after screening a kinase inhibitor library using image-based HCA [51].

The image-based dengue HT/HCA developed in this study was used to screen 4,000 compounds belonging to the BioFocus kinase inhibitor library. Primary screening against all four dengue serotypes required 16,000 experiment points (4,000 compounds×4 dengue serotypes), excluding the positive and negative controls. The entire primary screening took 11 days in total: 3 days for expansion of Huh-7.5 from a single T175 tissue culture (TC) flask to 8 T175 TC flasks, 4 days for host cell plating and virus infection in the 384-well plates containing the compounds, 2 days for image acquisition, 1 day for image analysis using the IM platform, and 1 day for data analysis. Two previous image-based screening campaigns for dengue antivirals were conducted with lab-adapted DENV2 (New Guinea C) whole virus [30,51]. One of these campaigns [51] further investigated the hit compounds by testing the antiviral activities against other lab-adapted dengue serotypes. Our image-based dengue HT/HCA screening campaign differs from the previous image-based HTA in three aspects: First, we used a novel target-focused chemical library (BioFocus kinase inhibitor library) whose collection of small molecules has not been thoroughly screened and characterized. Second, the compounds were screened against low passage strains of field isolated dengue viruses (with the exception of DENV4 tvp360), which allows the identification of compounds that may be active towards prevalent strains. Third, the entire 4,000 compound subset of the BioFocus kinase inhibitor library was screened against all four dengue serotypes. By screening all the compounds of the library against the four dengue serotypes, we can identify novel compounds that may be active against all four serotypes or specific toward any of the serotypes. Such findings can have biological implications on the differences between the viral infection process of the 4 serotypes at the cellular and molecular level. This offers an advantage over the primary screening using the DENV2 serotype and subsequent confirmation of activity with the other serotypes since the latter is already biased towards compounds active against DENV2, resulting in the “loss” of potential hit compounds that do not inhibit this particular serotype.

Screening of the BioFocus kinase inhibitor library using our image-based dengue HT/HCA resulted in the identification of 4 major clusters exhibiting inhibitory properties against dengue virus infection *in vitro*. Among them, one cluster consisting of 11 compounds having a 2-aminothiazole as a core scaffold, showed antiviral activities of varying degrees against the infection of DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 in the human hepatoma cell line Huh-7.5. The inability of these compounds to inhibit dengue infection in C6/36 initially suggests that the target is most likely a factor involving dengue virus infection in human cells. However, this discrepancy may also be attributed to other factors, such as difference in membrane permeability between the two different host cells or molecule uptake of the compounds into the host cell. Such differences in the physiology between the human and insect cells may affect the efficacy of these compounds in inhibiting dengue viral infection, but has not been thoroughly investigated in this study. Interestingly, none of the hit compounds from the 2-aminothiazole cluster significantly inhibited the infection of HCV and CHIKV in hepatoma cells, suggesting that the inhibitory property is more specifically directed towards dengue virus infection.

One major drawback when using cell-based assays in high-throughput screening is the effect of toxicity to the host cells, and by extension, viral infection. Compound toxicity can have a profound effect in the viral infection process, and may lead to inaccurate assessment of the antiviral activity. Since the HTS is conducted using only a single concentration of the compounds, it is impossible to avoid encountering those that exhibit moderate to high level of toxicity. Hence, a confirmatory assay that tests a

range of concentration is necessary to verify if these hit compounds indeed have antiviral activities. In addition, secondary assays are used to confirm compound activity and predict the mechanism of action. For cell-based assays that utilize image-based technology, determining compound toxicity with high certainty is more difficult. In the absence of biological markers that detect mitochondrial activity, cell apoptosis, cell starvation, the only indicator of compound toxicity is the relative cell number compared with non-treated controls. This can be misleading if the toxicity does not result in abolition of the cells or degradation of the cell nuclei since the cell number will not reflect the actual number of viable cells. Thus, it is essential to confirm compound toxicity by measuring production of ATP or relative oxygen species as an indicator of cell viability [52].

Time-of-addition assay, a strategy to determine the stage of inhibition during the viral infection cycle, has been used to characterize the mode of action of some inhibitors of dengue viral entry (NTTD Compound 6), viral replication (NTTD-982) and early translation (NTTD-2636) [39,47,53]. The inhibitor is added at different time points during viral infection and monitored for expression of the viral proteins, replication of the genome or production of infectious progeny virions. Among the 2-aminothiazole hit compounds identified in this study, CND1203 exhibited a strong antiviral activity against all 4 dengue serotypes, and blocked the formation of dengue virus plaques in Huh-7.5 at 25 μ M in the plaque reduction assay (Figure 5). Compound CND1203 was used for the time-of-addition assay, adding 25 μ M at different time points (−2 hpi, 0 hpi, 0.5 hpi, 1 hpi, 2 hpi, 4 hpi) of the dengue virus infection (M.O.I. 5) in Huh-7.5. In contrast to the strong inhibition of compound CND1203 against dengue viruses in the plaque reduction assay, none of the treatments inhibited dengue infection in the time-of-addition assay, suggesting that the compound does not interfere with viral entry (data not shown). Aminothiazole-based compounds have previously been implicated in the inhibition of HCV replication by binding to an allosteric site on the viral polymerase [54]. However, the structure of these active anti-HCV compounds differ from the 2-aminothiazole hit compounds reported in this study in terms of the substitutions on the scaffold. As a consequence, it is unlikely that our hit compounds interact with the viral polymerase.

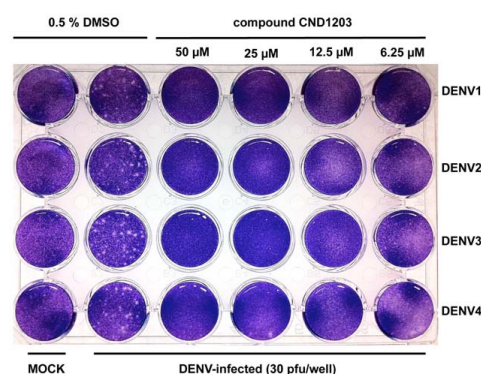


Figure 5. Plaque reduction assay. Huh-7.5 cells grown in 24-well tissue culture plate were inoculated with 30 pfu DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4 per well and incubated for 7 days in the presence of compound CND1203 at various concentrations. MOCK-infected wells were inoculated with VM only.
doi:10.1371/journal.pntd.0002073.g005

Although compound CND1203 did not inhibit DENV entry, its ability to inhibit the spread of DENV infection and formation of virus plaques in Huh-7.5 clearly suggest that the mode of action is at the post-entry stages. Two kinase inhibitors were previously reported to block virus assembly of dengue virions: Dasatinib, a thiazolaminopyrimidine that inhibit c-Src protein kinase, did not interfere with dengue RNA replication, but disrupted the proper assembly of dengue virions within virus-induced cell membranous replication complex [51]. SFV785, a trifluorinated *N*-methylalanine derivative that selectively inhibits NTRK1 and MAPKAPK5 kinase activity, altered the distribution of structural envelope protein from the reticulate network to enlarged discrete vesicles, consequently affecting the co-localization with the DENV replication complex and disrupting the assembly of progeny virions [55]. Interestingly, the 2-aminothiazole hit compounds identified in this study shares the aminothiazole moiety of Dasatinib, as well as the rings on each of the molecule. Based on the structural similarity with Dasatinib, c-Src kinase may be a candidate target of the 2-aminothiazole hit compounds, which would imply a post-genomic replication mode of action. Further investigation is necessary to support this hypothesis.

The persistence of dengue outbreaks around the world, and the lack of an available dengue vaccine reinforce the need to find and develop therapeutic drugs to address this major health concern. The use of HT/HCA screening technologies can expedite the drug discovery of potential dengue antivirals by facilitating the screening of large chemical libraries. The work reported here features an innovative image-based HT/HCA system that can be used as a reliable tool in screening for antiviral compounds against all four DENV serotypes. Furthermore, the compounds identified in the present study can serve as a potential starting point for the development of dengue antivirals.

Supporting Information

Figure S1 Development of the dengue HT/HCA. Workflow diagram of the dengue HT/HCA from assay development to the actual screening and hit confirmation (A). Flow chart of the immunofluorescence assay that includes image acquisition and analysis (B).
(TIF)

Figure S2 Infection Kinetics of DENV in Huh-7.5. Percentage of dengue-infected cells resulting from Den1 BR/90, BR DEN2 01-01, BR DEN3 290-2 and DEN4 TVP360 infection at various M.O.I. and incubation period.
(TIF)

Figure S3 Assay validation of the image-based dengue HT/HCA. Scatter plot and calculated Z'-factors of the dengue HT/HCA for DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4 infection in Huh-7.5. Dots represent DENV-infected (red) and MOCK-infected (blue) Huh-7.5 based on image analysis using in-house IM platform. Area under the black and green dotted lines represents the variability of the DENV infection and MOCK infection controls, respectively. The arrows represent the degree of separation (Z'-factor) between the two controls.
(TIF)

Figure S4 Profiling of primary hits from the dengue HT/HCA of the BioFocus kinase inhibitor library. *Left*: Dendrogram showing structural similarity of dengue primary hits based on tanimoto similarity index (<http://chemmine.ucr.edu>). *Right*: Percent inhibition of the 157 primary hits at 10 μ M against DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4 infection in Huh-7.5 and C6/36, HCV genotype 2a infection in Huh-7.5 and CHIKV infection in HuH-7.
(TIF)

Shades indicate range of activity: <50% (red), 50%–90% (yellow), >90% (green). The selected hit compounds belonging to the 4-(1-aminoethyl)-N-methylthiazol-2-amine cluster are marked (★). (TIF)

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Olivier Schwartz for providing the recombinant Chikungunya virus (CHIKV-118-GFP), and Juliano Bordignon for his helpful insights.

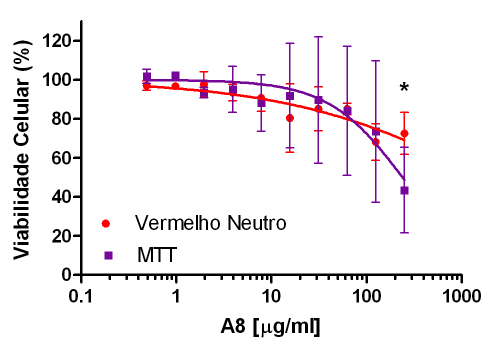
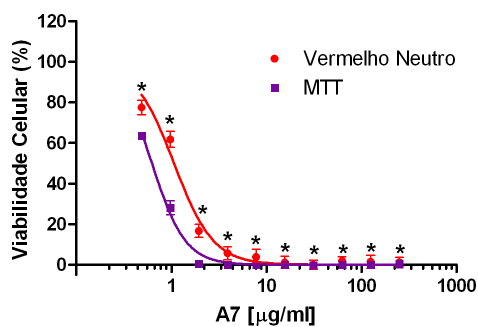
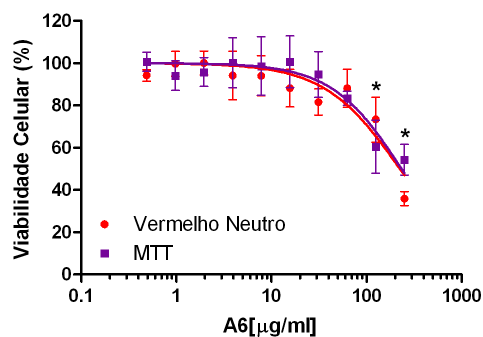
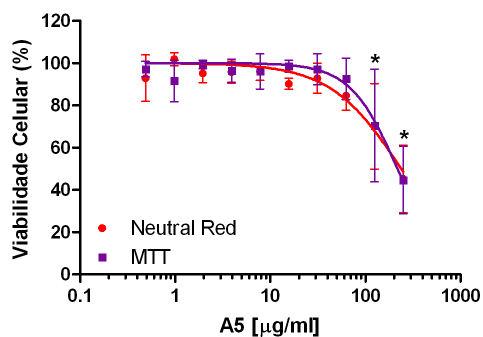
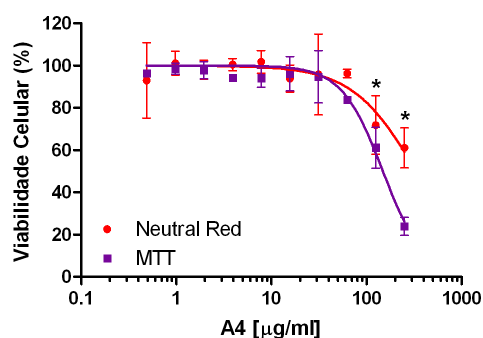
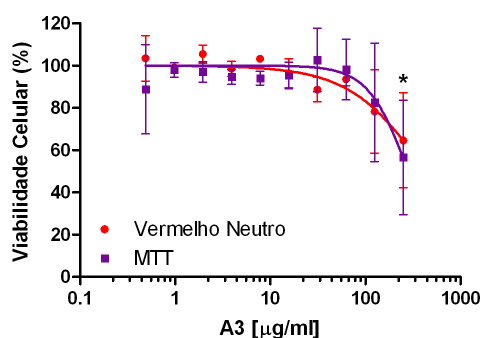
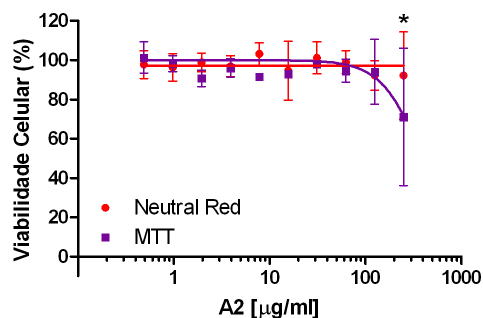
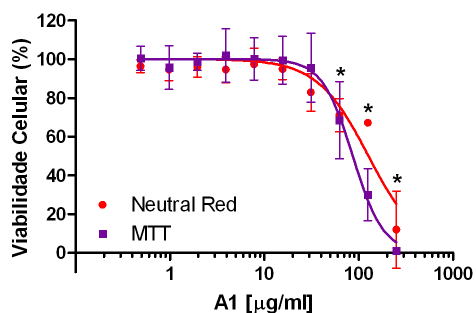
References

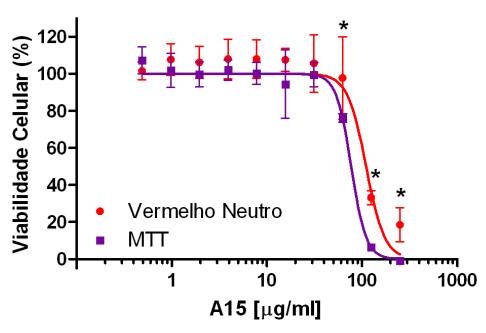
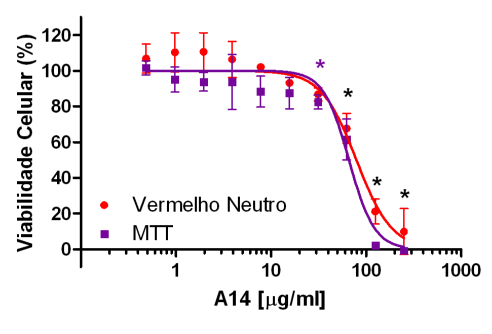
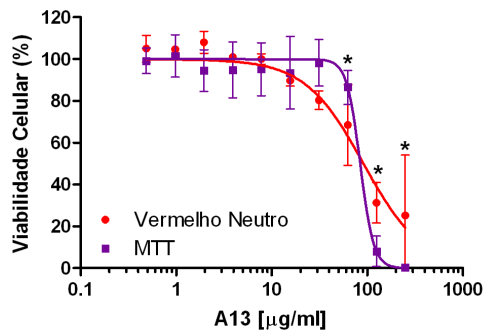
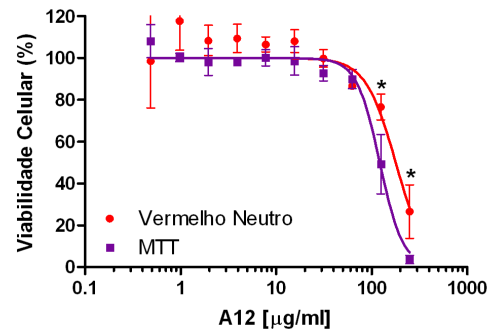
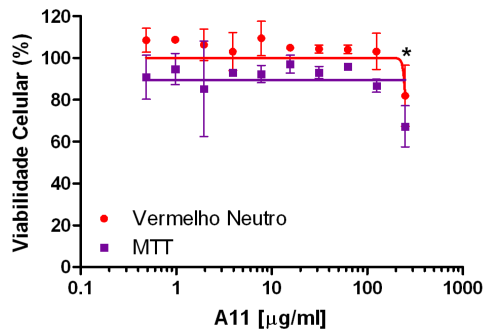
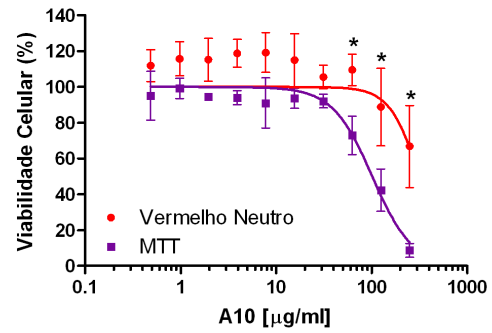
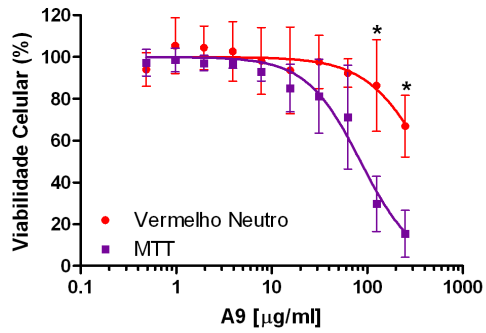
- Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480–496.
- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM (2007) Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 1101–1152.
- Smith TJ, Brandt WE, Swanson JL, McCown JM, Buescher EL (1970) Physical and biological properties of Dengue-2 virus and associated antigens. *J Virol* 5: 524–532.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649–688.
- Bartschlager R, Miller S (2008) Molecular aspects of dengue virus replication. *Future Microbiol* 3: 155–165.
- Weaver SC, Barrett ADT (2004) Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Rev Microbiol* 2: 789–801.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, et al. (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nature Rev Microbiol* 8: S7–S16.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Rev Microbiol* 5: 518–528.
- Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201–217.
- Guzman MG, Vazquez S (2010) The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses* 2: 2649–2662.
- WHO and TDR (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanaraj S, Innis BL, Nimmannitya S, et al. (2000) Dengue viremia titer, antibody response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181: 2–9.
- Kalayanaraj S, Gibbons RV, Vaughn D, Green S, Nisalak A, et al. (2007) Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis* 195: 1014–1017.
- Yin Z, Chen Y-L, Schul W, Wang Q-Y, Gu F, et al. (2009) An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20435–20439.
- Wang L, Chen R-F, Liu J-W, Lee I-K, Lee C-P, et al. (2011) DC-SIGN (CD209) promoter –336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e934. doi:10.1371/journal.pntd.0000934.
- Fischl W, Bartschlager R (2011) Exploitation of cellular pathways by dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 14: 470–475.
- Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, et al. (2010) A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in *flavivirus*-naïve adults. *J Infect Dis* 201: 370–377.
- Canard B (2010) Antiviral research and development against dengue virus. Available: http://denguedrugs.com/docs/Full_Length_Report.pdf. Accessed 09 March 2012.
- Entzeroth M, Plotow H, Condron P (2009) Overview of high-throughput screening. *Curr Protoc Pharmacol* 44:9.4.1–9.4.27. doi:10.1002/0471141755.ph0904s44.
- Igarashi A (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531–544.
- Després P, Frenkiel M-P, Deubel V (1993) Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196: 209–219.
- Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group specific determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 3: 830–836.
- Burgess RR (2009) Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol* 463: 331–342.
- Layne E (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol* 3: 447–454.
- Vincent L, Soille P (1991) Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations. *IEEE Trans Pattern Analysis and Machine Intelligence* 13: 583–598.
- Zhang J-H, Chung TDY, Oldenburg KR (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4: 67–73.
- Backman TW, Cao Y, Girke T (2011) ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Res* 39: W486–491.
- Shapiro LG, Stockman GC (2001) *Computer Vision*. Upper Saddle River: Prentice Hall, pp. 137, 150.
- Kanungo T, Mount DM, Netanyahu NS, Piatko CD, Silverman R, et al. (2002) An efficient k-means clustering algorithm: analysis and implementation. *IEEE Trans Pattern Analysis and Machine Intelligence* 24: 881–892. doi:10.1109/TPAMI.2002.1017616.
- Shum D, Smith JL, Hirsch AJ, Bhinder B, Radu C, et al. (2010) High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay Drug Dev Technol* 8: 553–570.
- Takampunya R, Ubol S, Houng H-S, Cameron CE, Padmanabhan R (2006) Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol* 87: 1947–1952.
- Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM (2008) Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol* 89: 3047–3051.
- Ajariyakhajorn C, Mammen MP Jr, Endy TP, Gettayacamin M, Nisalak A, et al. (2005) Randomized, placebo-controlled trial of nonpegylated and pegylated forms of recombinant human alpha interferon 2a for suppression of dengue virus viremia in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4508–4514.
- Harris CJ, Hill RD, Sheppard DW, Slater MJ, Stouten PFW (2011) The design and application of target-focused compound libraries. *Comb Chem High T Scr* 14: 521–531.
- Rothman AL (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Rev Immunol* 11: 532–543.
- Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, et al. (2004) Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol* 78: 4761–4775.
- Noble CG, Chen Y-L, Dong H, Gu F, Lim SP, et al. (2010) Strategies for development of dengue virus inhibitors. *Antiviral Res* 85: 450–462.
- Zhou Z, Khaliq M, Suk J-E, Patkar C, Li L, et al. (2008) Antiviral compounds discovered by virtual screening of small-molecule libraries against dengue virus E protein. *ACS Chem Biol* 3: 765–775.
- Wang Q-Y, Patel SJ, Vangrevelinghe E, Xu HY, Rao R, et al. (2009) A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1823–1831.
- Luzhkov VB, Selisko B, Nordqvist A, Peyrane F, Decroly E, et al. (2007) Virtual screening and bioassay study of novel inhibitors of dengue virus mRNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase. *Bioorg Med Chem* 15: 7795–7802.
- Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang Y-P, et al. (2009) Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. *Antiviral Res* 82: 110–114.
- Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ (2009) New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets* 9: 327–343.
- Freder V, Miertus S (2010) Design, structure-based focusing and *in silico* screening of combinatorial library of peptidomimetic inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease. *J Comput Aided Mol Des* 24:195–212.
- Yang C-C, Hsieh Y-H, Lee S-J, Wu S-H, Liao C-L, et al. (2011). Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 229–238.
- Hymel D, Peterson BR (2012) Synthetic cell surface receptors for delivery of therapeutics and probes. *Adv Drug Delivery Rev* in press.
- Xie X, Wang Q-Y, Xu HY, Qing M, Kramer L, et al. (2011) Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. *J Virol* 85: 11183–11195.
- Wang Q-Y, Bushell S, Qing M, Xu HY, Bonavia A, et al. (2011) Inhibition of dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis. *J Virol* 85: 648–656.
- Qing M, Liu W, Yuan Z, Gu F, Shi PY (2010) A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery. *Antiviral Res* 86: 163–171.
- Che P, Wang L, Li Q (2009) The development, optimization and validation of an assay for high throughput antiviral drug screening against dengue virus. *Int J Clin Exp Med* 2: 363–373.
- Götte M, Gabriel D (2011) Image-based high-content screening in drug discovery. In: Kapetanovic IM, editor. *Drug discovery and development – present and future*. Croatia: InTech, pp. 339–361.
- Chu JH, Yang PL (2007) c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3520–3525.

Drug Discovery for Dengue

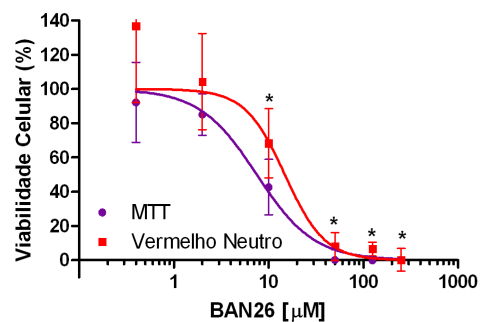
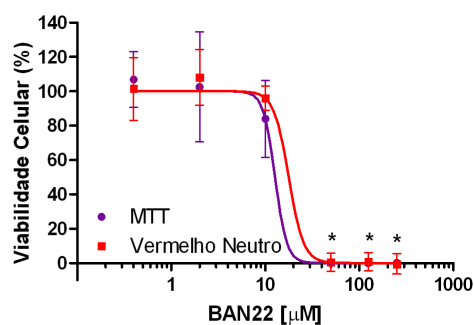
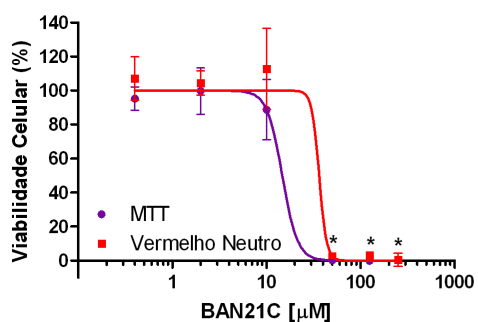
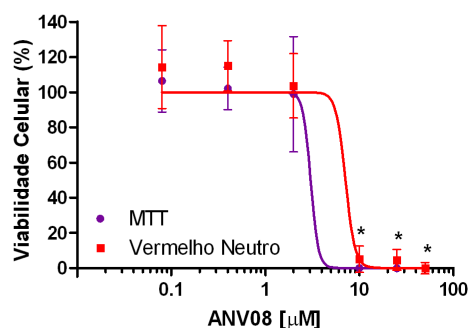
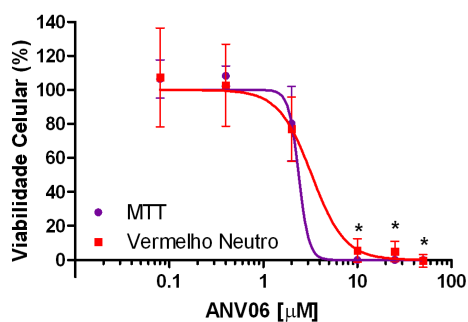
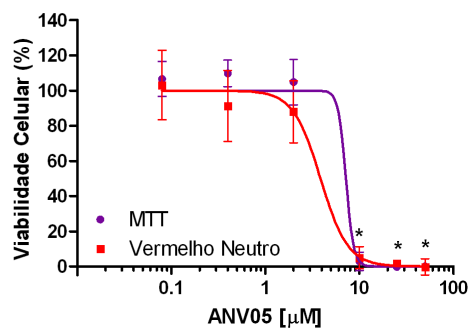
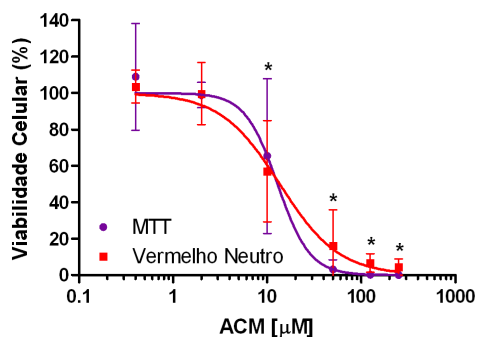
52. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell toxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421–5426.
53. Wang Q-Y, Kondredi RR, Xie X, Rao R, Nilar S, et al. (2011) A translation inhibitor that suppresses dengue virus *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4072–4080.
54. Shipps Jr GW, Deng Y, Wang T, Popovici-Muller J, Curran PJ, et al. (2005) Aminothiazole inhibitors of HCV RNA polymerase. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 115–119.
55. Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, et al. (2011) The kinase inhibitor SFV85 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. *PLoS one* 6: e23246. doi:10.1371/journal.pone.0023246.

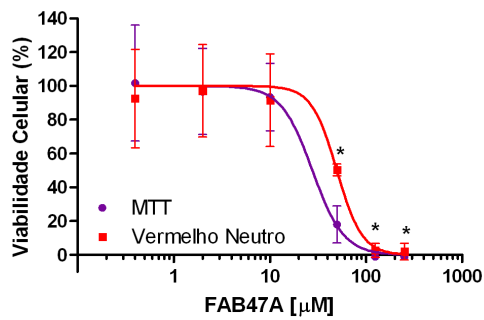
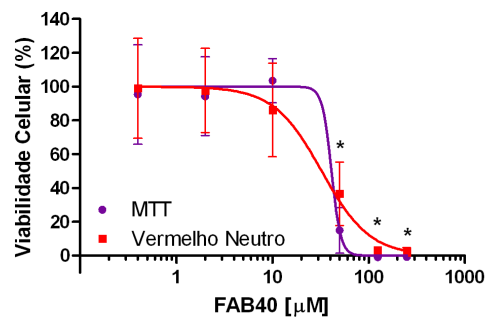
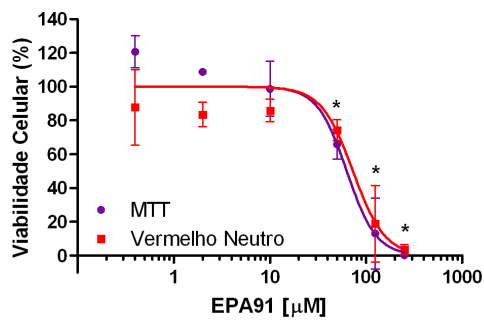
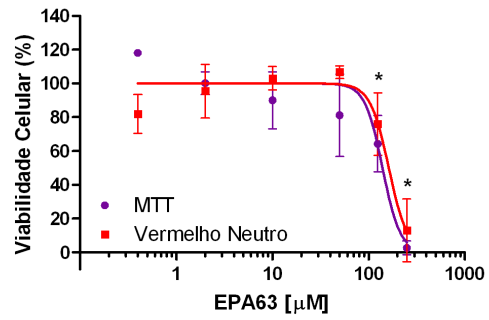
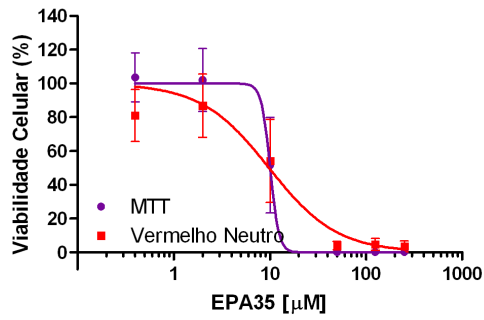
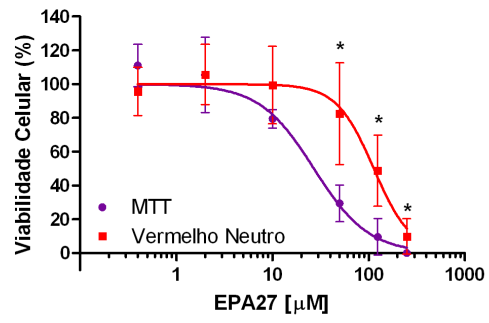
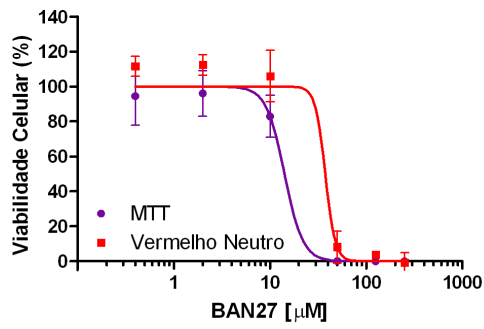
Apêndice II. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de algas em Huh7.5 com os ensaios de MTT e VN.

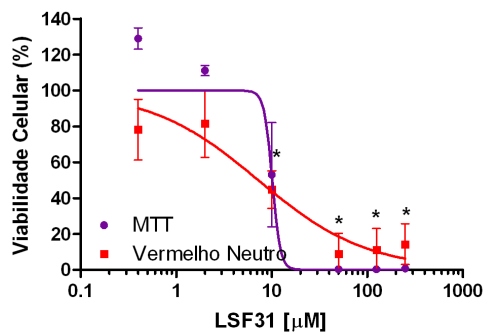
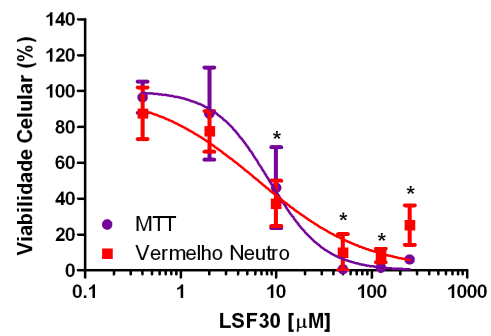
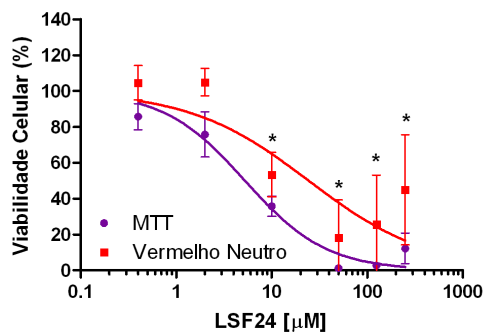
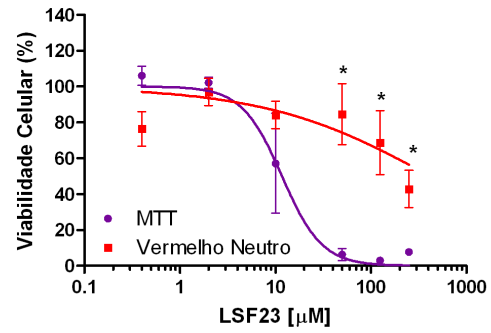
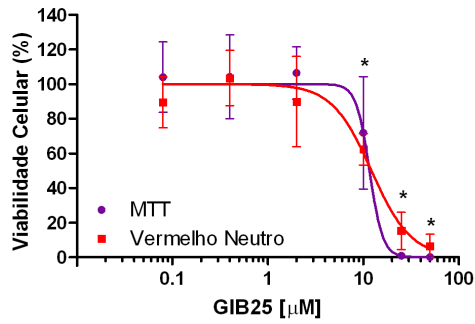
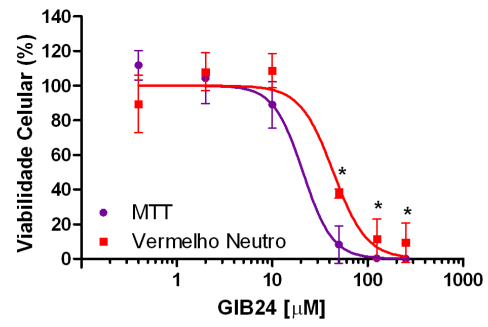
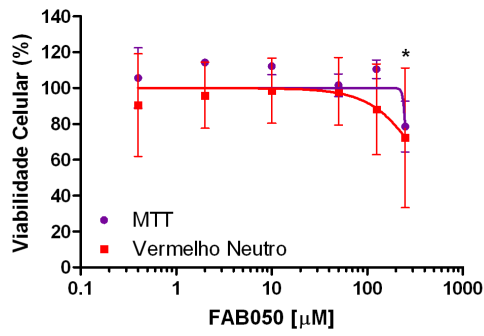


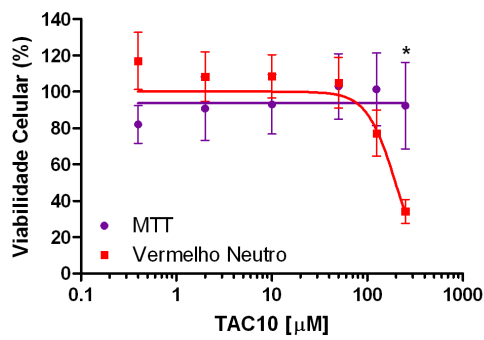
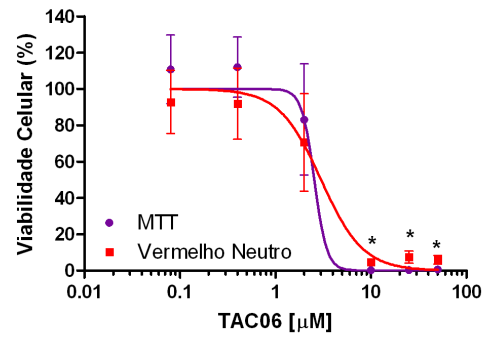
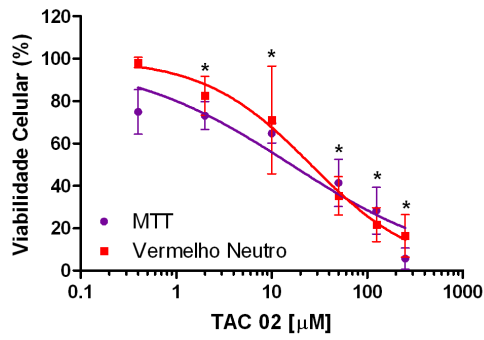
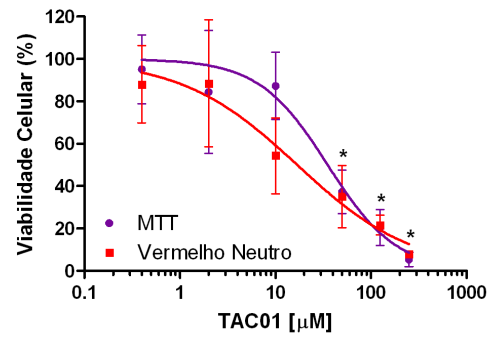
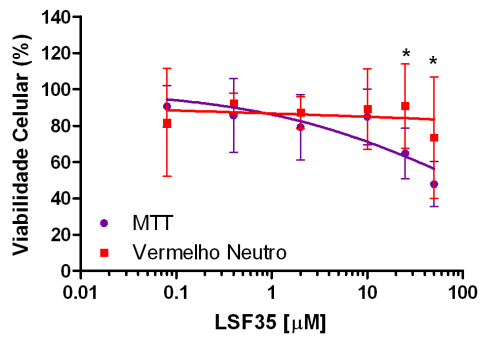
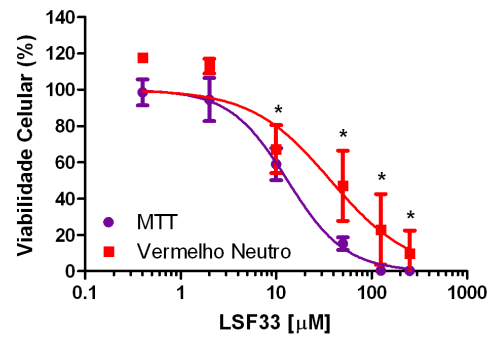
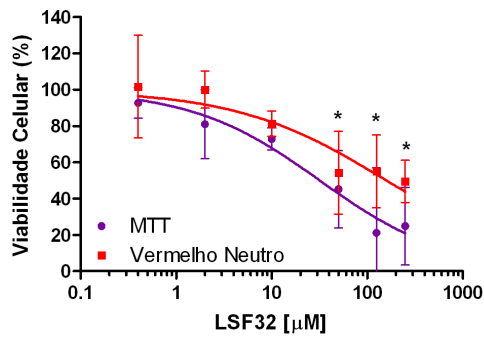


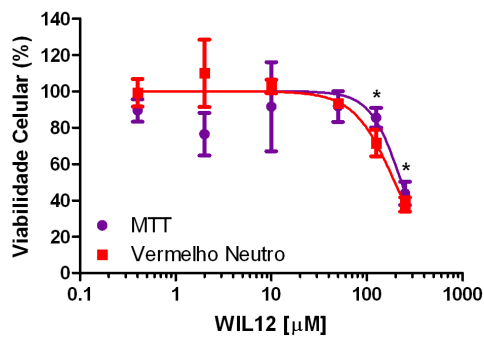
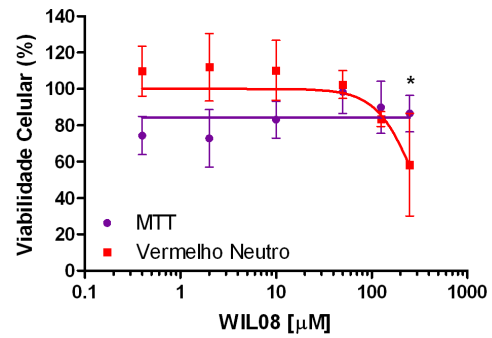
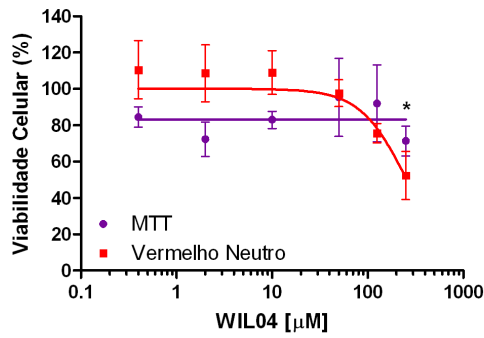
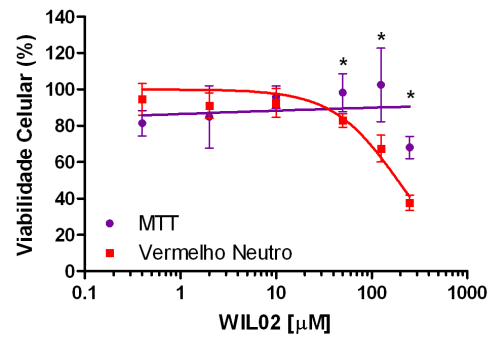
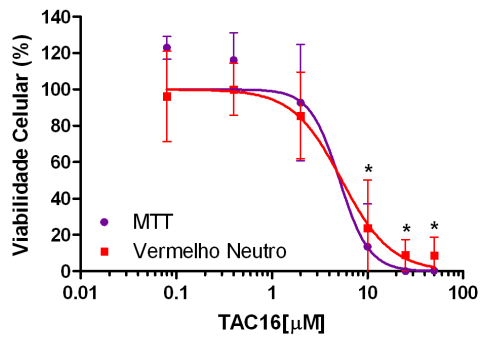
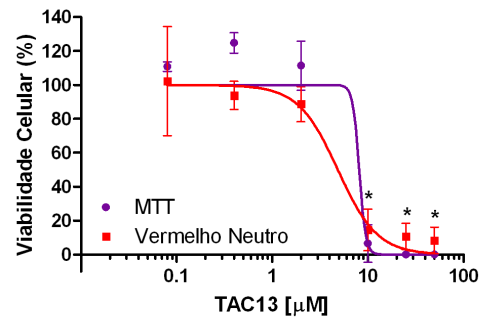
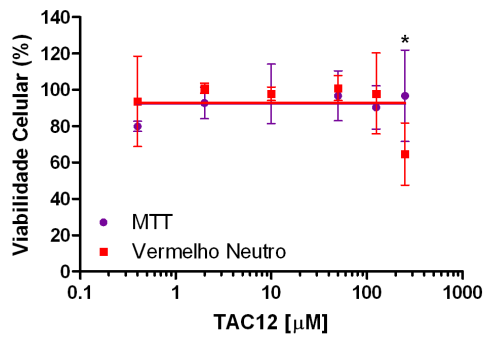
Apêndice III. Avaliação da citotoxicidade das substâncias químicas sintéticas em Huh7.5 com os ensaios de MTT e VN.

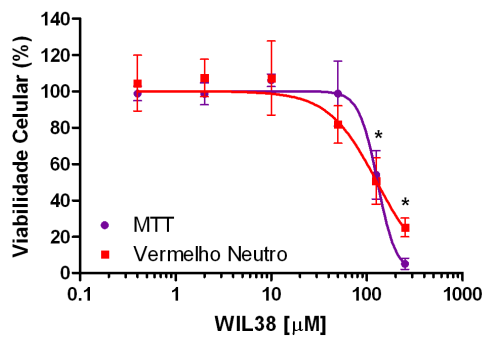
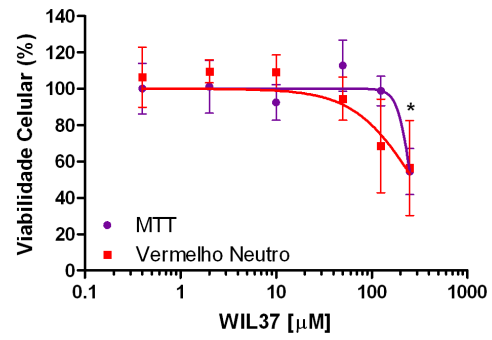
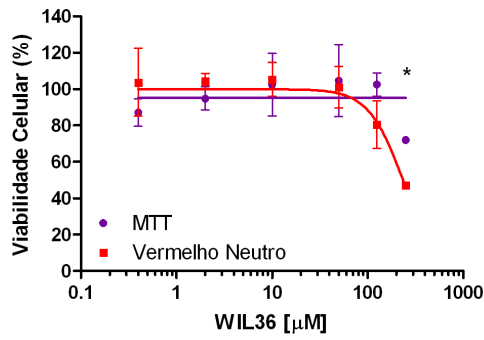
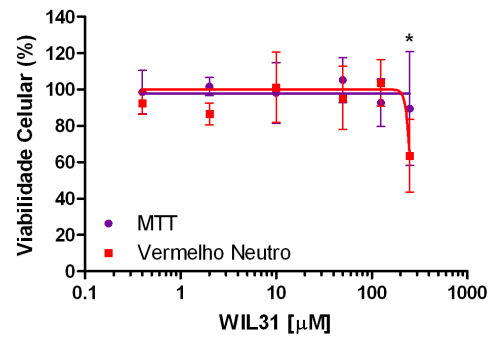
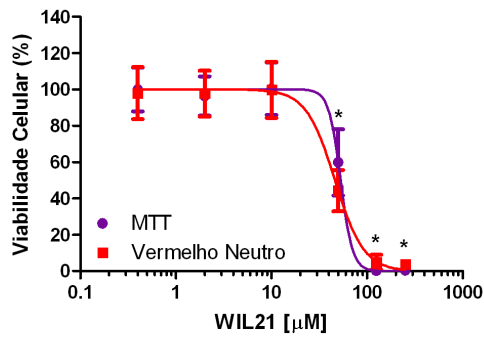
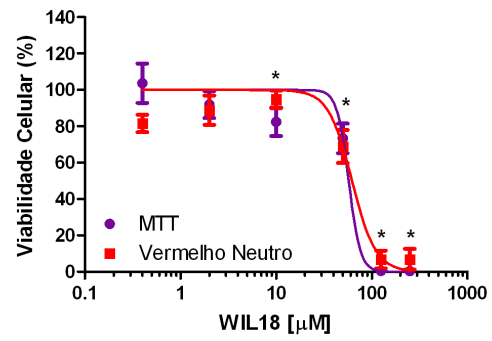
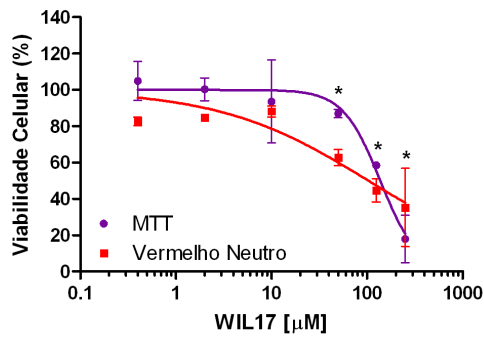


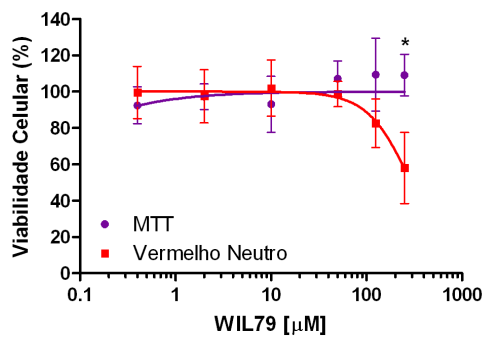
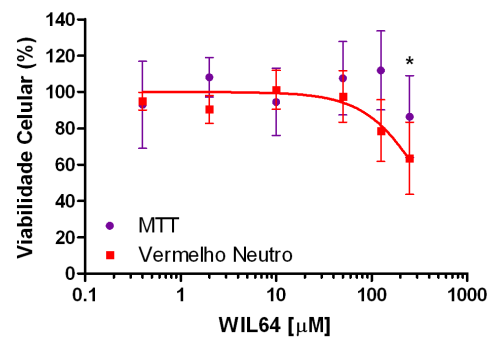
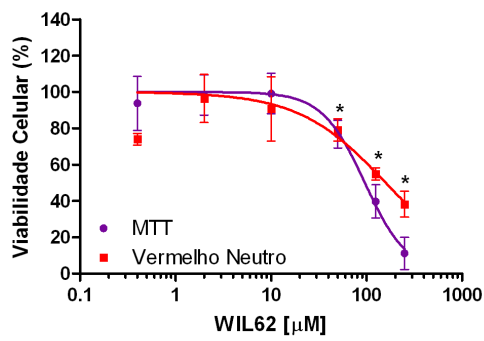
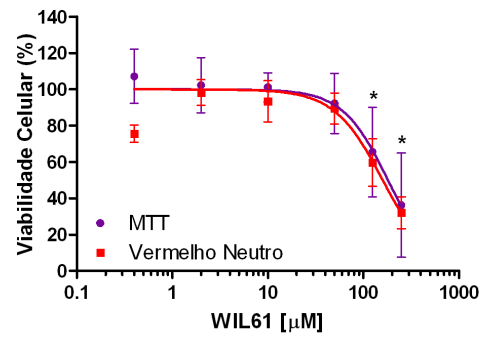
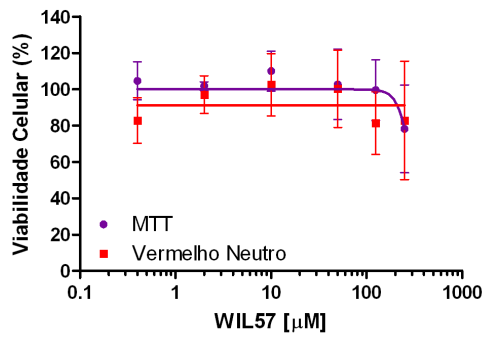
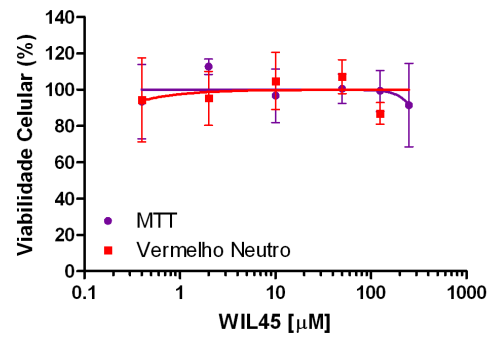
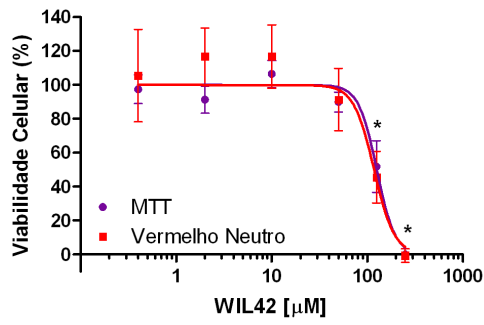












Apêndice IV. Artigo “Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an *In Situ* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”.

OPEN ACCESS Freely available online



Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an *In Situ* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Andrea Cristine Koishi^{1,2}, Paula Rodrigues Zanello², Éverson Miguel Bianco^{3*}, Juliano Bordignon^{2*}, Claudia Nunes Duarte dos Santos^{2*}

1 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil, **2** Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas (ICC-FIOCRUZ/PR), Curitiba, Paraná, Brazil, **3** Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

Abstract

Dengue is a significant public health problem worldwide. Despite the important social and clinical impact, there is no vaccine or specific antiviral therapy for prevention and treatment of dengue virus (DENV) infection. Considering the above, drug discovery research for dengue is of utmost importance; in addition natural marine products provide diverse and novel chemical structures with potent biological activities that must be evaluated. In this study we propose a target-free approach for dengue drug discovery based on a novel, rapid, and economic *in situ* enzyme-linked immunosorbent assay and the screening of a panel of marine seaweed extracts. The *in situ* ELISA was standardized and validated for Huh7.5 cell line infected with all four serotypes of DENV, among them clinical isolates and a laboratory strain. Statistical analysis showed an average S/B of 7.2 and Z-factor of 0.62, demonstrating assay consistency and reliability. A panel of fifteen seaweed extracts was then screened at the maximum non-toxic dose previously determined by the MTT and Neutral Red cytotoxic assays. Eight seaweed extracts were able to reduce DENV infection of at least one serotype tested. Four extracts (Phaeophyta: *Canistrocarpus cervicornis*, *Padina gymnospora*; Rhodophyta: *Palisada perforate*; Chlorophyta: *Caulerpa racemosa*) were chosen for further evaluation, and time of addition studies point that they might act at an early stage of the viral infection cycle, such as binding or internalization.

Citation: Koishi AC, Zanello PR, Bianco EM, Bordignon J, Nunes Duarte dos Santos C (2012) Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an *In Situ* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. PLoS ONE 7(12): e51089. doi:10.1371/journal.pone.0051089

Editor: Gajendra P. S. Raghava, CSIR-Institute of Microbial Technology, India

Received: July 18, 2012; **Accepted:** October 29, 2012; **Published:** December 5, 2012

Copyright: © 2012 Koishi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by CNPq, Fundação Araucária and Fiocruz. EMB (post-doctoral fellowship PRODOC/DQF/UFPE jan2009-april2010) and PRZ are supported by fellowships from CAPES. ACK and CNDs are CNPq fellowship recipients. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: clsantos@tecpar.br (CNDs); jbordig@tecpar.br (JB)

‡ Current address: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Introduction

Dengue is the most important mosquito-borne viral disease in the world. It is a significant public health concern that transcends geographical boundaries, being endemic in more than 100 countries within tropical and subtropical regions of the world [1]. It is believed that two-fifth of the world's population live in infection-risk areas and that around 50 million new infections and 25 thousand deaths occur annually [1,2]. The total economic burden of dengue illness in the Americas was estimated to cost US\$ 2.1 billion per year on average [3]. However, this value is most likely underestimated due to a large number of non-reported cases.

Dengue virus (DENV) belongs to the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family, and is presently classified into four different serotypes (DENV-1, -2, -3 and -4), and all of them are capable of causing the disease. Mature virions present a positive single-stranded RNA genome enclosed by a nucleocapsid exhibiting icosahedral symmetry, with the envelope and membrane proteins protruding from the host lipid bi-layer membrane [4]. The viral

genome of approximately 11 Kb presents a Cap at its 5' end and has a single open reading frame that encodes for one polyprotein that is cleaved in the course of and post translation in 3 structural and 7 non-structural proteins (5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') [5].

Clinical manifestations of DENV infection vary from an undifferentiated fever (dengue fever, DF) to more severe forms like dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), which can lead to death. The severity of disease might be related to strain virulence, host factors and/or secondary infections with heterologous serotypes [6–8] suggesting that immunopathological mechanisms are involved with the disease progression [9,10].

Despite the important social and clinical impact of the disease, dengue treatment is palliative. At present, there is no FDA-approved vaccine or specific antiviral therapy for prevention and treatment of dengue. Considering the described scenario, drug discovery research for dengue is of great importance. To our knowledge, there are currently ten drug discovery programs in the pre-clinical or discovery stages for dengue, including RNAi

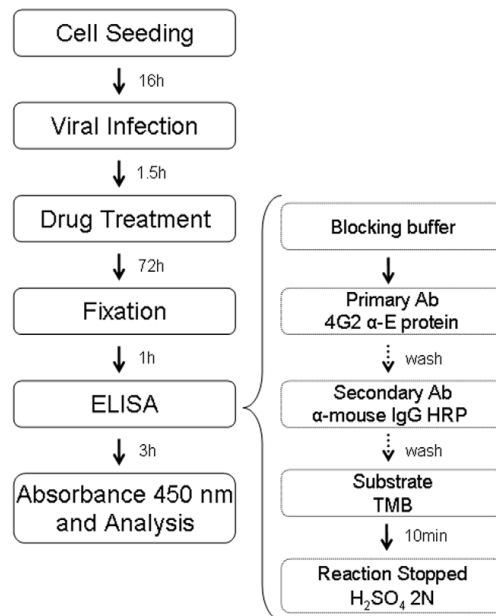


Figure 1. *In situ* ELISA assay workflow.
doi:10.1371/journal.pone.0051089.g001

therapeutics and natural products. However there are still no antiviral drugs being tested against dengue disease in any clinical trial [11].

Some reports demonstrate possible dengue viral inhibitors to different targets as viral adsorption and entry [12], NS3 protein [13], RNA replication and viral translation [14] or host processes [15]. Yin *et al.* (2009) [16] characterized an adenosine analog capable of reduce viremia, TNF- α and IL-6 production, preventing the death of infected mouse. Among the compounds tested, there are thousands of synthetic small molecules and natural products. Recently, the study of the biological activity of seaweeds extracts became a growing field of interest with the isolation and characterization of thousands of novel compounds with pharmacological properties from different marine organisms [17].

The antiviral activity screening of compounds is accomplished using several approaches, a number of them are low-throughput as the plaque reduction assay that is laborious, time consuming and have a subjective measurement. On the other hand, there are a number of high-throughput assays reported for anti-dengue infection screening [18–20], which are quantitative and can test a large number of compounds, however they often use new technologies as equipments, robots and software that are expensive and of restrict use.

To circumvent these issues, some researchers used an *in situ* ELISA for the screening of antiviral agents for influenza A virus [21]; varicella-zoster virus [22] and human cytomegalovirus [23]. Based on that, we propose a simple target-free approach for dengue drug discovery using a cell based ELISA, which is adaptable to automation and provides objective and rapid results, making use of materials and reagents common to many

laboratories. The assay was standardized, validated and used to screen a panel of chemical compounds present in seaweed extracts.

Materials and Methods

Cell Lines and Viruses

Human-derived hepatoma cells (Huh7.5, ATCC PTA-8561) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12 medium) (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and 100 IU/ μ g/ml penicillin/streptomycin (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) at 37°C in an humidified, 5% CO₂-controlled atmosphere. C6/36 *Aedes albopictus* cells (ATCC CRL-1660) were grown in Leibovitz L-15 medium (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% FBS, 0.26% tryptose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 25 μ g/mL gentamicin (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY, USA) at 28°C.

DENV-1/FGA/89 was isolated from a patient with dengue fever in South America in 1989 and kindly supplied by Dr. Philippe Desprès, from Unite des Interactions Moléculaires Flavivirs-Hôtes from Pasteur Institut, Paris, France. DENV-1/BR/90, DENV-2/BR/01-01, DENV-2/ICC265 and DENV-3/97 are clinical isolates from dengue fever obtained in Brazil between the years of 1990 and 2004. DENV-3/5532 was isolated from a fatal case of dengue with visceral complications in Lambaré, Paraguay in 2007. DENV-4/TVP360 is a laboratory strain kindly supplied by Dr. Ricardo Galler from Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Virus stocks were propagated in C6/36 cells and titrated by foci-forming immunodetection assay.

Foci-forming Immunodetection Assay

Viral titers were determined by the foci-forming immunodetection assay in C6/36 cells (FFU_{C6/36}), as previously described [24]. Briefly, cell culture supernatants were serially diluted and added to 24 well titration plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) in duplicate. After 1 h 30 min, the inoculum was removed and a CMC overlay media (L-15 supplemented with 10% SFB, 0.52% tryptose, 50 μ g/mL gentamicin, 1.6% carboxymethylcellulose) was added. The immunostaining was performed after seven days using the mouse monoclonal *Flavivirus* group-specific antibody 4G2 (hybridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112), followed by goat anti-mouse immunoglobulin conjugated to alkaline phosphatase (Promega, Madison, WI, USA), which was detected by adding a solution of NBT (nitroblue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt) (Promega, Madison, WI, USA) as a substrate. Foci was counted and expressed as FFU_{C6/36}/ml.

In situ Cellular Enzyme-linked Immunosorbent Assay Optimization and Validation

Several parameters as optimal cell density per well (1.6×10^5 – 5×10^5), multiplicity of infection (MOI of 4–0.01) for each virus serotype, cell fixation reagents (methanol:acetone or paraformaldehyde followed by permeabilization with triton X-100), blocking buffers (FBS or skim milk) and time of incubation after infection (48 h or 72 h) were analyzed.

The best conditions were determined and used for the subsequent tests. Briefly, after fixation with methanol:acetone, blocking buffer (2% skim milk, 0.05% Tween-20 PBS) was added and after 30 min the primary antibody 4G2 was added. Plates were incubated for 1 h at 37°C and then washed four times with

Table 1. Marine seaweeds selected for antiviral screening, location of collection and cytotoxicity activity in Huh7.5 cells.

Seaweed Species	Location (Latitude/Longitude)	CC50 (μg/ml) ^a		MNTD ^b (μg/ml)	Extract Code
		Neutral Red	MTT		
Phylum Phaeophyta ^c					
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula & De Clerck	Paraíso Beach (08°21'S; 34°57'W)	127.0	86.56	31.25	A1
<i>Dictyota mertensii</i> (Martius) Kützing	Itapuama Beach (08°17'S; 34°57'W)	111.7	77.07	31.25	A15
<i>Dictyopteris delicatula</i> J.V. Lamour	Calhetas Beach (08°20'S; 34°56'W)	>250	>250	125	A2
<i>Padina gymnospora</i> (Kütz.) Sond.	Boa Viagem Beach (08°07'S; 34°53'W)	>250	>250	125	A3
<i>Lobophora variegata</i> (J. V. Lamour.) Womersley ex E. C. Oliveira	Calhetas Beach (08°20'S; 34°56'W)	>250	148.5	62.5	A4
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i> E. de Paula & E. C. Oliveira	Paraíso Beach (08°21'S; 34°57'W)	237.7	217.3	62.5	A5
<i>Sargassum vulgare</i> var. <i>vulgari</i> C. Agardh	Paraíso Beach (08°21'S; 34°57'W)	224.1	233.2	62.5	A6
Phylum Rhodophyta ^c					
<i>Digenia simplex</i> (Wulfen) C. Agardh	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	>250	85.26	62.5	A9
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	1.069	0.6260	<0.5	A7
<i>Palisada perforata</i> (Bory) K.W. Nam	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	>250	239.5	125	A8
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen in Jacquin) J. V. Lamour.	Paraíso Beach (08°21'S; 34°57'W)	>250	101.6	31.25	A10
<i>Gracilaria</i> sp.	Viagem Beach (08°07'S; 34°53'W)	>250	>250	125	A11
Phylum Chlorophyta ^c					
<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory) Kütz.	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	91.40	84.38	31.25	A13
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i> (Forssk.)	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	79.13	66.05	31.25	A14
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh var. <i>racemosa</i>	Suape Beach (08°22'S; 34°56'W)	178.6	121.8	62.5	A12

^aCC50:50% cytotoxic concentration ($\mu\text{g/ml}$).^bMNTD: maximum non-toxic dose based on MTT and Neutral Red assays.^cPhaeophyta = Brown seaweeds; Rhodophyta = Red seaweeds; Chlorophyta = Green seaweeds.

doi:10.1371/journal.pone.0051089.t001

washing buffer (0.01% Tween-20 PBS). The secondary antibody goat anti-mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and after 1 h incubation at 37°C, plates were washed four times with washing buffer. TMB substrate (KPL, Gaithersburg, USA) was added and incubated for 10 min to allow color development; the reaction was stopped with 2N H₂SO₄. Absorbance was read at a wavelength of 450 nm in a microplate reader (Synergy HI M, Biotek, USA) (Figure 1).

For assay validation, Huh7.5 cells were infected with all DENV serotypes at a range of MOIs and after 72 h the *in situ* ELISA and the foci-forming immunodetection assay from the same culture were compared by way of Pearson's correlation coefficient. A second validation was done by infecting Huh7.5 cells with DENV-4 at a MOI of 0.1, followed by treatment with IFN- α 2A (Blausiegel) in a dose response curve. The results of the *in situ* ELISA, the foci-forming assay and a commercial NS1 antigen capture ELISA (Panbio Dengue Early ELISA - second generation, Alere, Australia) were compared. Interferon- α 2A was then used as a reference control and the IC50 (concentration that inhibits 50% of virus infection) was determined using a DRC for all dengue virus serotypes.

Seaweed Collection

Marine seaweeds from the phylum Phaeophyta, Rhodophyta, and Chlorophyta were collected in the intertidal zone of Pernambuco State coast, Brazil, in August-October 2009

(Table 1). The seaweed material was cleaned manually from epiphytic organisms immediately after collection, and air-dried. Specimens were identified and voucher specimens were deposited at the Botany Herbarium of the Biology Department at Pernambuco Federal University, Brazil.

Chemical Extraction of Marine Seaweeds

Air-dried algal material (10 g per species) were exhaustively extracted at room temperature with dichloromethane/methanol (2:1), yielding 15 dichloromethane/methanol crude extracts, which were evaporated to dryness at low temperature (<50°C) on a rotary evaporator [25], which was resuspended in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) for a concentration of 25 mg/ml and stored in aliquots protected from the light at -20°C.

Cell Viability Assay

Seaweed extracts cytotoxicity was assessed simultaneously by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] and Neutral Red (N-Red) assays [26]. Briefly, Huh7.5 cells were cultivated into a 96 well flat bottom plate at a density of 2×10^4 cells/well. After 16 hours of incubation cells were treated with the seaweed extracts in a two fold serial dilution in triplicate and incubated at 37°C and 5% CO₂. A blank control (medium only) and cell control (cells only) were also included in every assay plate. After 72 h of incubation, the supernatant was removed and 33 $\mu\text{g/ml}$ of N-Red reagent was added to each well and the plate

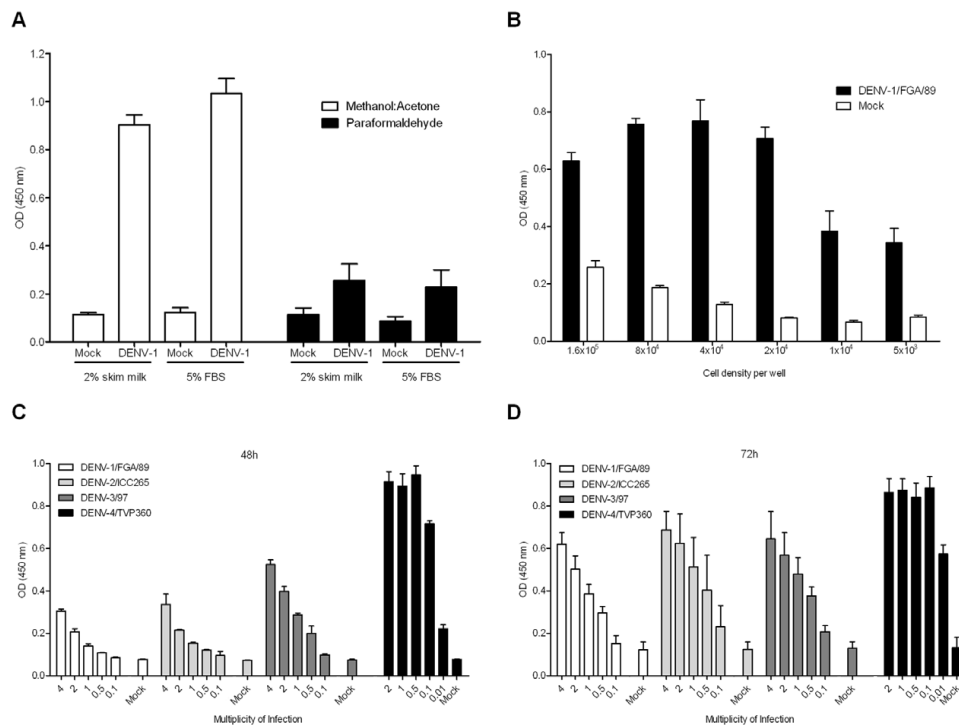


Figure 2. *In situ* ELISA optimization. (A) Effect of different blocking buffers (skim milk and FBS) and fixatives (methanol:acetone and paraformaldehyde followed by triton X-100) for the assay. (B) Cells were seeded in a range of concentration and the influence for the assay performance was evaluated. (C) The ideal MOI for all DENV serotypes was evaluated 48 hours post-infection and (D) 72 hours post-infection. Values represent mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g002

was incubated for 1 h at 37°C, 5% CO₂. Additionally, 0.5 mg/ml of MTT was added for another 2 h at 37°C and 5% CO₂. After removal of the medium, 150 μ l of extracting solution (1% acetic acid, 30% ethanol) was added to each well and incubated for 15 min under agitation to extract the N-Red dye. The solution was then transferred to another microplate, and the absorbance was determined by spectrophotometry at 550 nm. The MTT formazan crystals were extracted by adding 150 μ l of DMSO. Optical density was measured at 550 nm and 630 nm differential reading with a microplate reader (Synergy H1 M, Biotek, USA). Data were normalized following the equation: Cell viability (%) = (sample value - blank control)/(cell control - blank control) \times 100. A dose response curve was obtained using a non-linear regression (curve fit), and the cytotoxic concentration 50% (CC50) was calculated as the concentration required to reduce cell viability by 50%.

Antiviral Screen of Marine Seaweed Extracts

The seaweed extracts were screened in triplicate at the maximum non-toxic dose (MNTD) in 1% DMSO, which was determined by the MTT and N-Red assays. A negative control (1% DMSO medium) and a positive control (EC90 for Interferon- α 2A) were included in all test plates. Huh7.5 cells were seeded at a density of 2×10^4 cells per well on a flat-bottom 96-well plate, 16 h prior to infection. Culture medium was removed and 100 μ l of

viral inoculum (MOI of 4 for DENV-1, -2 and -3; and MOI of 0.1 for DENV-4) was added to wells and plates were incubated for 1 h 30 min at 37°C, 5% CO₂. The inoculum was replaced with 200 μ l of medium or each seaweed extract dilution. After a 72 h incubation period, cells were fixed and the ELISA performed as previously described. Data were normalized as % of infection in relation to the controls, where the OD obtained with the non-infected culture were taken as 0% infection, and the one obtained with the non-treated infected culture as 100% infection.

Time of Addition Assays

Huh7.5 cells at a density of 2×10^4 cells per well were infected with DENV-4 at a MOI of 0.1 and the viral antigen quantification was performed by the *in situ* ELISA and viral progeny by the foci-forming assay. In this experiment, three different time points were tested. The MNTD of the seaweed extracts A1, A3, A8 and A12 were added 1 h 30 min before the infection (i), during the infection (time 0 h) (ii) and 1 h 30 min after the infection (iii). Furthermore, the during infection treatment was performed with a serial dilution of each seaweed extract, and a DRC, IC50 and the selectivity index (SI = CC50/IC50) were calculated.

Binding and Internalization Assays

The assays were performed as previously described [27] with some modification. Briefly, the virus binding assay was done with

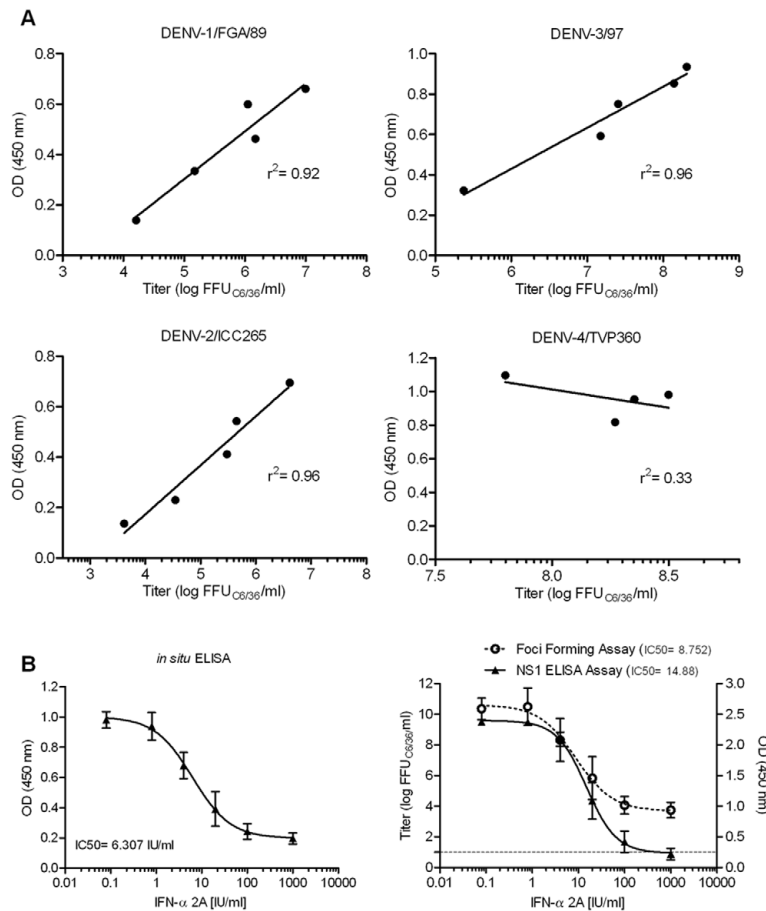


Figure 3. *In situ* ELISA assay validation. (A) Correlation between the *in situ* ELISA and the foci-forming assay, where Huh7.5 was infected with DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 at a range of MOI (4–0.01). After 72 hours of infection the supernatant was used for the foci-forming assay and the cells submitted to the ELISA assay. Data from one representative experiment, analyzed using Pearson correlation test. (B) Comparison of the DRC and the IC₅₀ for IFN- α 2A and DENV-4 infection, obtained with the *in situ* ELISA, foci-forming assay and a commercial NS1 antigen capture ELISA assay. Mean \pm SD of three independent experiments, analyzed by sigmoidal dose-response curve (variable slope), the dashed line represents the detection limit of the foci-forming assay. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g003

Huh7.5 cells seeded in 96-well plates and infected with DENV-4 with a MOI of 0.1 in the presence or absence of the seaweed extracts at the MNTD and incubated for 1 h at 4°C. The inoculum was removed and the cells washed twice with cold PBS. Complete medium was added to wells and the plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 72 h. After the incubation period the *in situ* ELISA was performed as described before.

For the virus internalization assay, Huh7.5 cells were seeded in 96-well plates and infected with DENV-4 with a MOI of 0.1. After an incubation of 1 h at 4°C, the non adsorbed virus was removed and cells were washed with PBS. Medium with or without the seaweed extracts at the MNTD were added to wells and incubated at 37°C for 1 h. After the post-adsorption period, cells were washed with PBS and treated with 0.1 ml of citrate buffer (citric acid 40 mM, potassium chloride 10 mM, sodium chloride

135 mM, pH 3) for 1 min to inactivate adsorbed but not internalized virus. Cells were then washed with PBS and complete medium was added, plates were then incubated at 37°C, 5% CO₂ for 72 h and the ELISA was performed as previously described. For both assays the neutralizing antibody 4G2 was used as a control.

Virucidal Assay

The virucidal assay was done as described by Burghgraeve *et al.* (2012) [28] with some modifications. DENV-4 (2×10^5 FFU_{C6/36}/ml) was incubated at 37°C in the presence or absence of the seaweed extracts at the MNTD and the positive control consisted of purified virus RNA. All samples were incubated in the presence or absence of 150 μ g/ml RNase A (USB). After one hour, viral RNA was isolated using QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

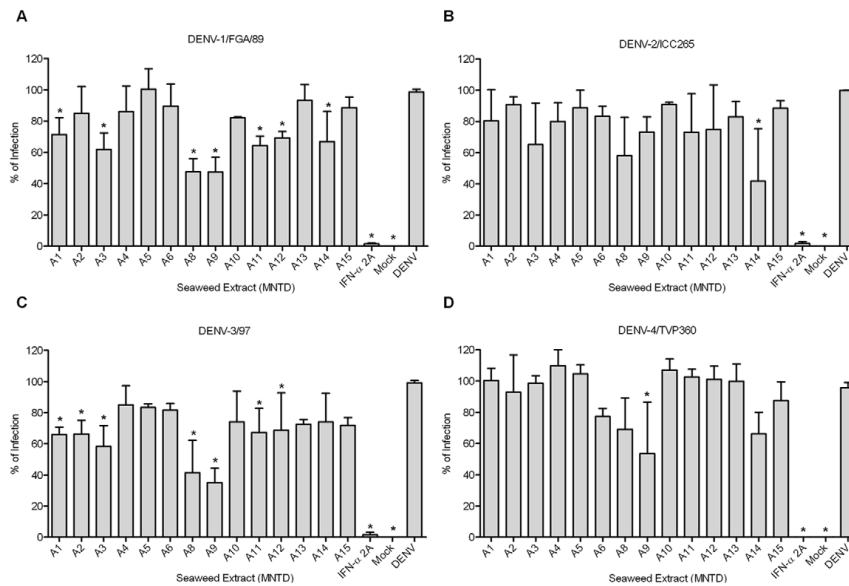


Figure 4. Seaweed extracts antiviral screening. (A) Huh7.5 were seeded in a 96-well plate and infected with DENV-1, (B) DENV-2 and (C) DENV-3 with an MOI of 4, and (D) DENV-4 with an MOI of 0.1. Interferon- α 2A (100 IU/ml) was used as a positive control and after 72 hours post-infection the ELISA was performed. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test. Values are mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g004

and the samples were subjected to RT-PCR [29] and gel electrophoresis.

Statistical Analysis

After normalization, data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey or Dunnett tests; Pearson correlation test was used to compare different assays; and the sigmoidal dose-response (variable slope) for CC50 and IC50. The level of significance for the analysis was set at $p < 0.05$. The analysis were performed with Prism Software (GraphPad version 5.0c, San Diego, CA, USA).

Assay performance was analyzed by measurements of the signal to background $S/B = (M_{\max}/M_{\min})$, and the Z-factor $= 1 - [3 \times (SD_{\max} + SD_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})]$ where M_{\max} and M_{\min} represent the mean optical density values of positive and negative controls, and SD_{\max} and SD_{\min} are the respective standard deviations for those [30].

Results and Discussion

Optimization of the *in situ* ELISA Assay

Despite being the most important mosquito-borne viral disease in the world, currently there is no specific antiviral therapy available for dengue infection treatment. A safe and efficient anti-dengue virus drug should ideally have the potential to reduce the total number of people developing clinical manifestations of the disease and provide protection for people who travel to regions where DENV is endemic.

To accomplish this, there are a number of requirements to be fulfilled. An anti-dengue drug should have an easy route of

administration, stability, a long shelf-life and be reasonably priced. With respect to clinical efficacy, the drug must be active against all four dengue serotypes in both primary and secondary DENV infections, with a good safety profile [1].

Therefore the development of DENV specific antiviral drugs is of high priority to improve the disease scenario worldwide. To identify inhibitors of DENV infection, a 96-well format cell-based ELISA was adapted, which allows testing drug covering a broad range of concentrations and rapid spectrophotometric analysis using an automated plate reader. An *in situ* ELISA method was described by Figueiredo & Shope (1987) [31], and then used with the objective of diagnosis, surveillance and serum-epidemiological studies for the detection of IgM and IgG antibodies using infected mosquito cells as antigen [32]. However there are few reports using the *in situ* ELISA as an anti-dengue drug screening technique. Ying Wang *et al.* (2009) [12] named an *in situ* ELISA as cell-based *Flavivirus* immunodetection (CFI) assay, and it was used to screen the anti-dengue virus replication activity of 111 compounds in A549 cell line. The same assay was later used to assess the inhibition of DENV RNA synthesis by an adenosine nucleoside [33] and an ester prodrug of an adenosine analog [34].

To obtain better results, several aspects of the assay were optimized. Initially, fixative reagents were evaluated. The cell fixation procedure using the organic solvents methanol and acetone showed better results when compared to fixation with paraformaldehyde and permeabilization with triton X-100 (Figure 2A). Another advantage of the first fixation procedure is that it precipitates proteins and dissolves lipids from cell membranes making them permeable to antibodies at the same time [35]. Additionally, blocking unspecific reaction using 2%

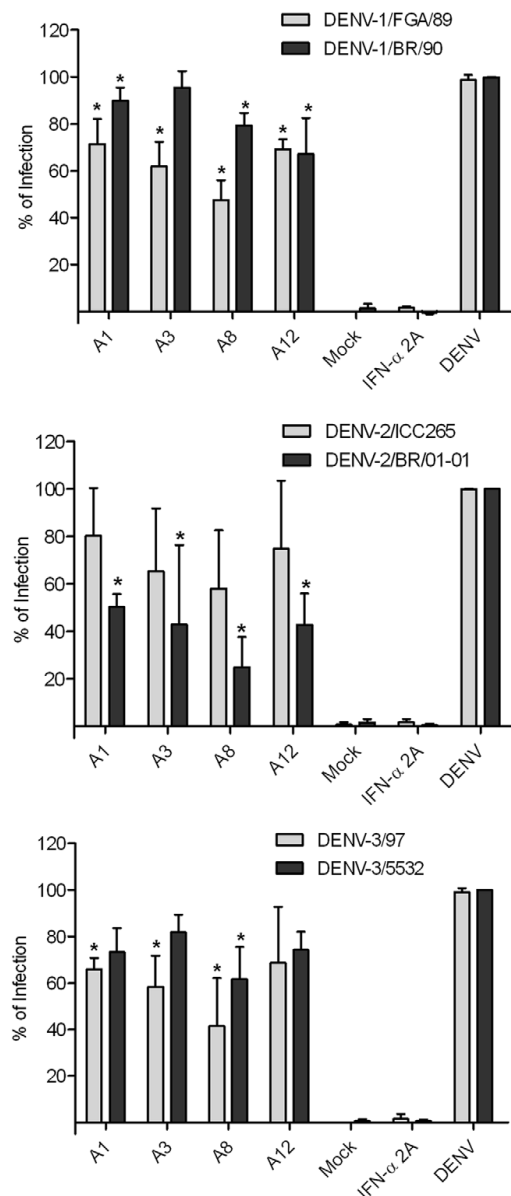


Figure 5. DENV infection inhibition for different strains/serotypes. Huh7.5 was seeded in a 96-well plate and infected with each strain with a MOI of 4 for 1 h30 min, then the seaweed extracts were added and after 72 hours the ELISA was performed. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett test. Values are mean \pm SD of three independent experiments, * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g005

skim milk or 5% FBS demonstrated similar efficiency, and 2% skim milk was selected for its availability.

Next, the cell density per well was evaluated, and six different concentrations of Huh7.5 cells in the range of 5×10^3 and 1.6×10^5 per well (two fold dilution) were seeded. After 16 h, cells were infected with DENV-1/FGA/89 with a multiplicity of infection (MOI) of 4 for 1 h30 min, then the inoculum was removed, complete medium was added and plates were incubated for additional 72 h. The intermediate concentration tested (8×10^4 – 2×10^4) yielded the highest absorbance readings (Figure 2B) and the cell density of 2×10^4 showed the best signal to background rate ($S/B = 5.8$) and was used for further tests. Cells at a concentration higher than 1.6×10^5 per well tended to overgrow and detach from the wells during washes, giving lower absorbance and higher background values.

The final steps for the *in situ* ELISA standardization were to define the MOI for each DENV serotype and the time of incubation after infection. For all DENV serotypes, with exception of DENV-4/TVP360, the highest absorbance values were observed with a MOI of 4 at 72 hours post infection. DENV-4/TVP360 presented high optical density (OD) readings for both time points and even for the lowest MOIs tested, then the MOI of 0.1 at 72 h post infection was chosen (Figure 2C and 2D); this might be related to the fact that this is a laboratory strain adapted to cell culture. In relation to time of incubation after the infection, a longer period of incubation as expected showed higher OD values, probably because it allowed for more cycles of virus replication.

The *in situ* ELISA assay described here constitutes a rapid and reliable screening method for inhibitors of DENV infection in mammalian cells, in which the DENV envelope (E) protein was detected using the 4G2 antibody. Previous studies have confirmed that the level of E protein is reflective of the level of infectious virus production and that a reduced production of E protein could potentially be an indication of reduced viral entry, genome replication, or protein translation and processing [19].

Antiviral Assay Validation

To validate the proposed *in situ* ELISA, it was compared to the foci-forming assay commonly used to detect virus infection inhibition [14,24]. Both assays were performed in parallel using cells and supernatant from the same culture. The comparison between OD values and virus titer for DENV-1, -2 and -3 yielded linear and highly correlated data (average $r^2 = 0.95$). However this result was not observed for DENV-4 (Figure 3A), as it shows high OD and titer values for all the MOIs tested, maybe because DENV-4/TVP360 is a laboratory strain adapted to cell culture, different from the other low passage clinical isolates used in this study. In addition the comparison of the dose response curve (DRC) and the IC50 for IFN- α 2A and DENV-4 infection by the foci-forming assay and a commercial NS1 antigen capture ELISA assay (Figure 3B), confirmed that the *in situ* ELISA is reliable to screen antiviral activities.

IFN- α is an antiviral drug used in the treatment of hepatitis C infection [36], and proved to be an effective *in vitro* replication inhibitor of several pathogenic flaviviruses, including dengue [37]. Based on that, interferon- α 2A was used as a reference control, and showed a dose dependent virus inhibition with a mean IC50 of 2.94; 2.32; 2.64 and 5.70 IU/ml for DENV serotypes 1, 2, 3 and 4 respectively (Figure S1). The concentration of 100 IU/ml was used as the IC90 and the positive control of the assay.

Seaweed Extracts Cytotoxicity

A disadvantage of the *in situ* ELISA assay for the screening of antiviral agents is that it does not give information about compound cytotoxicity, thus prior to antiviral testing it is

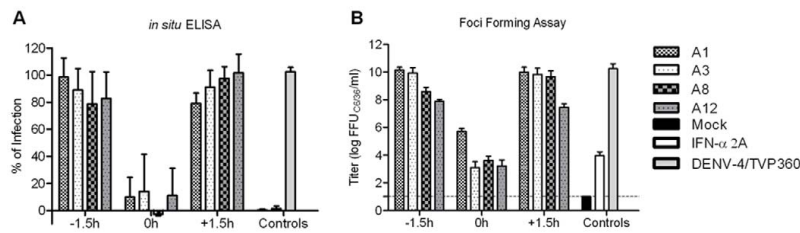


Figure 6. Time of addition studies with seaweed extracts A1, A3, A8 and A12. (A) Huh 7.5 cells were infected with DENV-4 with an MOI of 0.1 following each treatment (before the infection, -1.5 h; during the infection, 0 h; and after the infection, +1.5 h) at the MNTD, the cells were submitted to the ELISA assay (B) and the supernatant for the foci-forming assay. The dashed line represents the detection limit of the foci-forming assay. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g006

important to apply a cell viability test. Several reports show that some seaweed extracts or compound isolated from seaweeds have cytotoxic effect in cancer cells [38,39]. To ascertain the seaweed extracts cytotoxicity in Huh7.5 cells we choose to use two assays that assess cell viability through different mechanisms. The MTT assay, which is based on the reduction of the yellow tetrazolium

salt MTT to purple formazan crystals by living cells with active cellular reductases in the mitochondria [40] and the N-red uptake assay that is based on cell's capacity to maintain pH gradients in lysosomes, through the production of ATP [41]. A dose response curve was obtained for each seaweed extract, the CC50 was calculated and the maximum non-toxic dose (MNTD) was

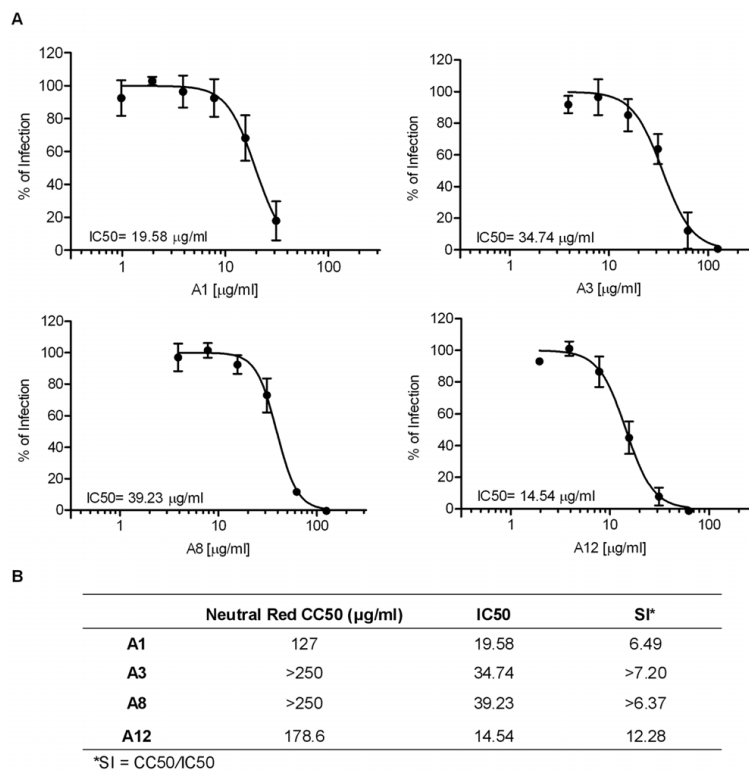


Figure 7. Dose response curve for the seaweed extracts A1, A3, A8 and A12. (A) Huh 7.5 cells were infected with DENV-4 and treated during the infection in a range of concentration for each seaweed extract. (B) CC50, IC50 and SI were calculated. Mean ± SD of three independent experiments, analyzed by sigmoidal dose response curve (variable slope). doi:10.1371/journal.pone.0051089.g007

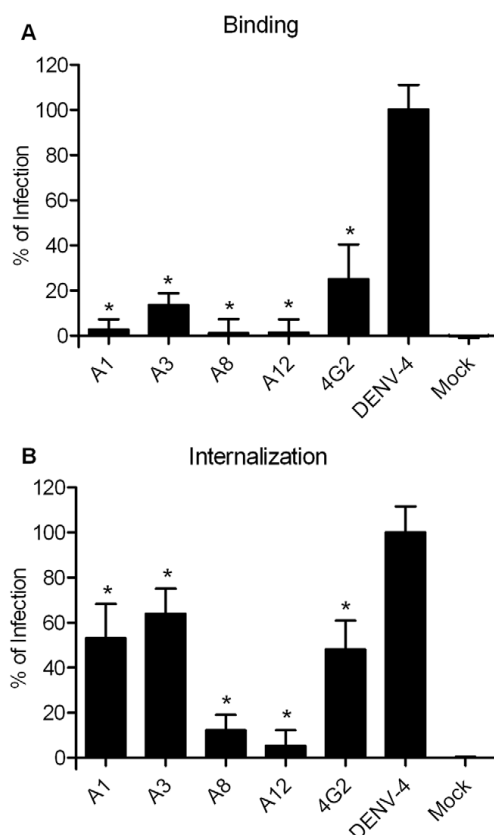


Figure 8. Effect of the seaweed extracts A1, A3, A8 and A12 on DENV-4 entry process. (A) Binding inhibition assay. (B) Internalization inhibition assay. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett test. Values are mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0051089.g008

determined for the antiviral test based on both assays (Table 1). We found similar results for CC50 between the two assays, and N-red seems to be more sensitive than the MTT assay, corroborating with a previous study that shows that the N-red presents less interference, is more sensitive and does not use unstable reagents as required for the viability tests using tetrazolium salts (MTT, MTS, XTS) [42]. Seaweed extract A7 was highly toxic and was not tested in the screening assay.

Seaweed Extracts Antiviral Screening

Natural products offer a privileged starting point in the search for specific and potent modulators of biomolecular function as well as novel drugs [43]. The marine environment is of great importance to the global biodiversity. It is predicted that there are ~8.7 million eukaryotic species globally, of which ~2.2 million are marine, offering an almost infinite resource for novel compounds [44,45].

Marine organisms are known producers of pharmacological and antiviral agents and may provide unlimited biological resources for

the production of therapeutic drugs against viral infections in humans. Extracted compounds from seaweeds have *in vitro* and/or *in vivo* activity against a wide range of viruses, including herpes viruses (HSV-1, HSV-2, HCMV), togaviruses (Sindbis virus, Semliki Forest virus), paramyxoviruses (RSV), rhabdoviruses (VSV), and both human and simian immune deficiency viruses (HIV and SIV) [17]. In relation to dengue virus, a sulfated polysaccharide named fucoidan showed a potent inhibition when DENV-2 was pretreated with it, however none effect was observed for other DENV serotypes [46].

The seaweed extract antiviral screening against all dengue serotypes was performed in the 96-well format *in situ* ELISA. The well-to-well variation was evaluated by the measurement of standard statistical parameters, the average S/B was 7.2 and Z-factor was 0.62. Fifteen seaweed extracts were screened at the MNTD, and extracts A1, A2, A3, A8, A9, A11, A12 and A14 presented a statistical dengue infection inhibition when compared to controls (Figure 4).

A study with two sulfated polysaccharides obtained from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata* showed that the antiviral activity against dengue was dependent on virus serotype and host cell. It was demonstrated a considerable inhibition of DENV-2 multiplication in Vero cells, lower antiviral effect against DENV-3 and DENV-4, and no effect against DENV-1 [27]. In our study we also observed such differences and in order to ascertain if it was serotype or strain specific, four seaweed extracts were chosen among the hits for DENV-1 and -3, being two from the *Phaeophyta* (A1 and A3), one from the *Rhodophyta* (A8) and one from the *Chlorophyta* Phylum (A12). These extracts were tested against other strains from each serotype, except DENV-4 for its unavailability (Figure 5). The results demonstrate that the infection inhibition by these extracts seems to be serotype and strain independent.

Seaweed Extracts A1, A3, A8 and A12 Act at an Early Stage during Dengue Virus Infection

All the experiments up to here were performed as post-infection treatment, in this way we might have missed compounds with mechanism of action in early infection steps, like virus adsorption and entry or even virucidal effect. Harden *et al.* (2009) [47] evaluated the antiviral activity of extracts from *Undaria pinnatifida*, *Splachnidium rugosum*, *Gigartina atropurpurea*, and *Placanium cartilagineum* against HSV-1 and HSV-2. These extracts exhibited good activity when added during the first hour of viral infection, but were ineffective if added later and subsequent assays showed that the compounds had potent virucidal activity and were active at very low concentrations.

Time of addition experiments (Figure 6A) with the previously chosen extracts and DENV-4 infection pointed that these seaweed extracts might act at an early stage of the virus infection cycle. These results were confirmed by the foci-forming assay (Figure 6B).

Considering that the treatment during the infection (time 0 h) showed a high inhibition rate, DRC was performed using this treatment and the IC50 and SI were obtained (Figure 7). These four extracts showed promising SI values, and were comparable to glycyrrhizin anti-DENV treatment in Vero cells [37].

A possible virucidal effect of the seaweed extracts A3, A8 and A12 was discarded by the virucidal assay (Figure S2), and A1 might have a partial virucidal activity. These extracts were further evaluated in binding and internalization assays (Figure 8). Taken together, the results show that the major inhibition occurs during the binding process for seaweed extracts A1 and A3, with a lower inhibition during internalization. For the extracts A8 and A12 it seems that both steps are being inhibited.

In regard to the seaweed extracts composition, a previous study with similar dichloromethane/methanol extraction of two populations of *Canistrocarpus cervicornis* (source of A1) presented a total of fourteen diterpenes, among them dolastanes, ecodolastanes and seco-dolastane were detected. The results revealed a typical pattern for *C. cervicornis*, which did not vary according to the geographical region [25]. From *Padina gymnospora* (source of A3) only few metabolites classes were isolated until now, such as fatty acids [48], and sulfated polysaccharides [49]. From *Palisada perforada* (source of A8) only two triquiannes alcohols compounds were described [50]. And from genus *Caulerpa* (source of A12) was previously isolated fatty acid, sterols, terpenes, and alkaloids [51].

Conclusions

Data from our study demonstrated the standardization and validation of an *in situ* ELISA assay in a human cell line (Huh7.5) for the screening of antiviral compounds against all DENV-serotypes. The assay constitutes a reliable screening method for inhibitors of DENV infection in mammalian cells and shows to be reproducible with other dengue virus quantification techniques like the traditional foci-forming assay and the NS1 antigen capture ELISA. This standardized technique can be automated making possible the screening of larger number of compounds in a short period of time and with lower costs than other high-throughput methods. Additionally, the technique proved to be useful in the screening of 15 seaweed extracts isolated from the Brazilian coast, and demonstrated that 8 seaweed extracts were able to reduce DENV-antigen production in Huh7.5. Further studies demonstrated that the seaweed extracts A3, A8 and A12 are not virucidal, but seems to act at an early stage of the virus infection cycle, as shown by the time of addition experiment, and that the antiviral activity is serotype independent. There is an important inhibition of the binding process by A1 and A3, with lower suppression during internalization, and it seems that both steps are inhibited by A8 and A12 seaweed extracts. These extracts also presented a

good selectivity index and will be further analyzed regarding the extract composition.

Supporting Information

Figure S1 Dose response curve for interferon- α 2A. (A) Cells were seeded and infected with DENV-1, (B) DENV-2 and (C) DENV-3 with an MOI of 4, and (D) DENV-4 with an MOI of 0.1. After 1 h30 min the inoculum was removed and the culture was treated with IFN- α 2A at a range of concentrations (1000–0.08 IU/ml). Values represent mean \pm SD of three independent experiments and were analyzed by sigmoidal dose-response curve (variable slope). (TIF)

Figure S2 Virucidal Assay. DENV-4 was incubated with the seaweed extracts A1, A3, A8 and A12 at the MNTD, in the presence or absence of RNase. After 1 h incubation at 37°C, RNA was isolated and subjected to RT-PCR and gel electrophoresis. (TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (DQF/UFPE) for laboratory support, Fabiola Barbieri Holetz (FIOCRUZ/PE) for helping in the seaweed collections, Thiago Nogueira de Vasconcelos Reis (DO/UFPE) for identification of seaweed materials, and Camila Zanluca (ICC-FIOCRUZ/PR) for 4G2 purification.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACK PRZ JB CNDDS. Performed the experiments: ACK PRZ. Analyzed the data: ACK PRZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB CNDDS. Wrote the paper: ACK EMB JB CNDDS. Collected and obtained the seaweed extracts: EMB.

References

- World Health Organization (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. France: WHO Press. 147 p.
- Guha-Sapir D, Schimmer B (2005) Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2: 1.
- Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH (2011) Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 84: 200–207.
- Henchal EA, Putnak JR (1990) The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376–396.
- Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649–688.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, et al. (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8: S7–S16.
- Malavice GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL (2004) Dengue viral infections. *Postgrad Med J* 80: 588–601.
- Halstead B, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201–217.
- Nielsen DG (2009) The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *J Virol* 6: 211.
- Rothman AL, Ennis FA (1999) Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 6: 1–6.
- BIO Ventures for Global Health (2007) Dengue Fever. Available: <http://www.bvgh.org/Biopharmaceutical-Solutions/Global-Health-Primer/Diseases/cid/ViewDetails/ItemID/3.aspx>. Accessed 2012 Nov 2.
- Wang Q-Y, Patel SJ, Vangrevelinghe E, Xu HY, Rao R, et al. (2009) A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1823–1831.
- Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, et al. (2008) Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res* 80: 94–101.
- Zhang XG, Mason PW, Dubovi EJ, Xu X, Bourne N, et al. (2009) Antiviral activity of geneticin against dengue virus. *Antiviral Res* 83: 21–27.
- Sayce AC, Miller JL, Zitzmann N (2010) Targeting a host process as an antiviral approach against dengue virus. *Trends Microbiol* 18: 323–330.
- Yin Z, Chen Y-L, Schul W, Wang Q-Y, Gu F, et al. (2009) An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20435–20439.
- Yasuhara-Bell J, Lu Y (2010) Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Res* 86: 231–240.
- Che P, Wang L, Li Q (2009) The development, optimization and validation of an assay for high throughput antiviral drug screening against Dengue virus. *Int J Clin Exp Med* 2: 363–373.
- Shum D, Smith JL, Hirsch AJ, Bhinder B, Radu C, et al. (2010) High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay Drug Dev Technol* 8: 553–570.
- Qing M, Liu W, Yuan Z, Gu F, Shi PY (2010) A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery. *Antiviral Res* 86: 163–171.
- Myc A, Anderson MJ Jr JRB (1999) Optimization of in situ cellular ELISA performed on influenza A virus-infected monolayers for screening of antiviral agents. *J Virol Methods* 77: 165–177.
- Berkowitz FE, Levin MJ (1985) Use of an enzyme-linked immunosorbent assay performed directly on fixed infected cell monolayers for evaluating drugs against Varicella-Zoster Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 28: 207–210.
- Ljungdahlstahle E, Schloss L, Sundqvist V, Brytting M, Hokeberg I, et al. (1998) Solid phase ELISA for determination of the virus dose dependant sensitivity of human cytomegalovirus to antiviral drugs in vitro. *Antiviral Res* 40: 105–112.
- Desprès P, Frenkiel MP, Deubel V (1993) Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196: 209–219.
- Oliveira AS de, Cavalcanti DN, Bianco EM, Paula JC de, Pereira RC, et al. (2008) Chemical composition of diterpenes from the brown alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Nat Prod Commun* 3: 1469–1472.
- Chiba K, Kawakami K, Tohyama K (1998) Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol in vitro* 12: 251–258.
- Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faria PCS, Nosedá MD, et al. (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res* 66: 103–110.

28. De Burghgraeve T, Kaptein SJF, Ayala-Nunez NV, Mondotte JA, Pastorino B, et al. (2012) An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry in vitro. *PLoS one* 7: e37244.
29. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545–551.
30. Zhang J-H (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4: 67–73.
31. Figueiredo LT, Shope RE (1987) An enzyme immunoassay for dengue antibody using infected cultured mosquito cells as antigen. *J Virol Methods* 17: 191–198.
32. Figueiredo LTM, Simões MC, Cavalcante SMB (1989) Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 702–707.
33. Chen Y-L, Yin Z, Duraiswamy J, Schul W, Lim CC, et al. (2010) Inhibition of dengue virus RNA synthesis by an adenosine nucleoside. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2932–2939.
34. Chen Y-L, Yin Z, Lakshminarayana SB, Qing M, Schul W, et al. (2010) Inhibition of dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3255–3261.
35. Jamur MC, Oliver C (2010) Cell Fixatives for Immunostaining. In: Jamur MC, Oliver C, editors. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press. 55–61.
36. Clercq ED (2009) Antiviral drug discovery: ten more compounds, and ten more stories (Part B). *Med Res Rev* 29.
37. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D (2003) Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* 58: 73–79.
38. Kim EJ, Park SY, Lee J, Han J, Park Y (2010) Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol* 10: 96.
39. Khanavi M, Nabavi M, Sadati N, Shams Ardekani M, Sohrabipour J, et al. (2010) Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biol Res* 43: 31–37.
40. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
41. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3: 1125–1131.
42. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988) Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays -The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol in Vitro* 2: 1–6.
43. Hong J (2011) Role of natural product diversity in chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* 15: 350–354.
44. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol* 9: e1001127.
45. Stengel DB, Connan S, Popper ZA (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv* 29: 483–501.
46. Hidari KJP, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, et al. (2008) Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 91–95.
47. Harden EA, Falshaw R, Carnachan SM, Kern ER, Prichard MN (2009) Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Res* 83: 282–289.
48. Ferreira LDS, Turatti ICC, Lopes NP, Guaratini T, Colepicolo P, et al. (2012) Apolar compounds in seaweeds from Fernando de Noronha archipelago (northeastern coast of Brazil). *Int J Anal Chem* 2012: 431954.
49. Marques CT, Azevedo TCGD, Benevides NMB, Rocha HAO, Lisboa E (2012) Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. *Rev bras farmacogn* 22: 115–122.
50. Fujii MT, Cassano V, Stein EM, Carvalho LR (2011) Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the Laurencia complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Rev bras farmacogn* 21: 268–282.
51. Aliya R, Shameel M (2003) Marine natural products of *Caulerpa* (Siphonocladophyceae). *Pak J Bot* 35: 659–669.